

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovatelů. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární biologie, genetika a virologie



**Bc. Martin Štach**

Studium pohybu polyomavirů z pozdního endozomu směrem k buněčnému jádru

Studies of polyomavirus trafficking from late endosomes towards the cell nucleus

Diplomová práce

Školitel: doc. RNDr. Jitka Forstová, CSc.

Praha, 2016

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15. 8. 2016

Podpis

Na tomto místě bych rád poděkoval **doc. RNDr. Jitce Forstové, CSc** za trpělivost, ochotu a pomoc při sepisování této práce a vyhodnocování výsledků. Dále děkuji **Mgr. Sandře Huérfano, PhD** za pomoc s vyhodnocováním dat a cenné rady pro práci, **Mgr. Borisovi Ryabchenko** za pomoc s konfokální mikroskopií a i celému kolektivu laboratoře molekulární virologie PřF UK za mnoho cenných rad a příjemné pracovní prostředí. Chtěl bych poděkovat své rodině za podporu při studiu. V neposlední řadě děkuji Martině Píchové za podporu při psaní této práce a pomoc s grafickým softwarem.



## Abstrakt

Myší polyomavirus (MPyV) je modelovým virem čeledi *Polyomaviridae*. Polyomaviry jsou malé neobalené DNA viry. U imunosuprimovaných pacientů způsobují vážné problémy. Je znám jejich onkogenní potenciál u zvířat i u lidí. Transport MPyV v buňce stále není úplně objasněn. Virus vstupuje hladkými monopinocytickými váčky, pokračuje do časných a pozdních endozomů. Odtud je transportován do ER zatím neznámým mechanismem. Vyhýbá se Golgiho aparátu (GA). Možná cesta z pozdních endozomů je zprostředkovává GTPázou Rab9 do *trans*-Golgi síťoviny (TGN) a poté COPI váčky do ER. Výzkum, zdali MPyV využívá tuto dráhu na cestě do ER, v minulosti ukazoval různé výsledky. V této práci byl zkoumán účinek inhibitorů retrográdního transportu (Brefeldinu A, Golgicidu A) na infekci MPyV. Brefeldin A není zcela specifický, má vliv na celý endozomální systém. Golgicid A specificky rozrušuje transport přes TGN a GA. Oba inhibitory infekci MPyV inhibovaly. Konfokální mikroskopií bylo zjištěno, že část populace virionů kolokalizuje během jejich transportu k jádru s markery TGN a COPI váček. MPyV nekolokalizoval s markerem *cis*-Golgi. Bohužel nebyl zjištěn vliv exprese dominantně negativní mutanty Rab9 na MPyV infekci, pro její vysokou cytotoxicitu. Avšak nadprodukce divokého typu Rab9 infekci usnadňovala. Výsledky podporují hypotézu, že MPyV z pozdních endozomů prochází přes TGN a odtud do ER pomocí COPI váček.

**Klíčová slova:** myší polyomavirus, retrográdní transport, Brefeldin A, Golgicid A, kolokalizace, *trans*-Golgi síťovina, COPI, Rab9

## **Abstract**

Mouse polyomavirus (MPyV) is a model virus of the *Polyomaviridae* family. Polyomaviruses are small non-enveloped DNA viruses. They cause severe problems to immunocompromised patients. Their oncogenic potential is known in animals and humans. Trafficking of MPyV within the cell is not clear yet. The virus enters via smooth monopinocytic vesicles and continues to early and late endosomes. From there, the virus is transported to the ER by unknown mechanism. It bypasses Golgi apparatus (GA). One possible pathway is from late endosomes to *trans*-Golgi network (TGN) facilitated by Rab9 GTPase and then in COPI vesicles to the ER. In this thesis, the effect of inhibitors of retrograde transport (Brefeldin A, Golgicide A) on MPyV infection was evaluated. Brefeldin A is not completely specific; it has effect on whole endosomal system. Golgicide A causes specific disruption of transport via TGN and GA. Both inhibitors suppressed infection of MPyV. Confocal microscopy revealed colocalization of some MPyV virions with markers of TGN and COPI vesicles. MPyV didn't colocalize with *cis*-Golgi marker. Unfortunately, the effect of overexpression of Rab9 dominant negative mutant couldn't been evaluated due to its high cytotoxicity. However, overexpression of wild type Rab9 slightly increased infectivity. The results support hypothesis that MPyV enters TGN and from there it travels in COPI vesicles to the ER.

**Keywords:** mouse polyomavirus, retrograde transport, Brefeldin A, Golgicide A, colocalization, *trans*-Golgi network, COPI, Rab9

## Obsah

1	Úvod .....	11
2	Literární přehled .....	13
2.1	Polyomaviry .....	14
2.2	Myší polyomavirus.....	15
2.2.1	Genom.....	15
2.2.2	Časné produkty .....	16
2.2.3	Pozdní produkty, struktura kapsidy .....	18
2.3	Transport polyomavirů v buňce .....	22
2.3.1	Vstup do hostitelské buňky.....	22
2.3.2	Transport z endozomů do ER .....	24
2.3.3	Transport do jádra.....	28
2.3.4	Replikace, morfogeneze a smrt buňky.....	29
2.4	Transport z pozdních endozomů do <i>trans</i> -Golgi síťoviny (TGN) .....	31
2.4.1	Role Rab9 .....	31
2.4.2	Role Rab7b .....	31
3	Cíle práce.....	33
4	Materiál a metody.....	35
4.1	Antibiotika.....	36
4.2	Kultivační média .....	36
4.2.1	Bakteriální média.....	36
4.2.2	Média pro tkáňové kultury.....	36
4.3	Protilátky .....	36
4.3.1	Primární protilátky .....	36
4.3.2	Sekundární proteilátky .....	37
4.4	Enzymy .....	37
4.5	Inhibitory.....	37
4.6	Markery molekulových hmotností .....	37
4.7	Vektory.....	38
4.8	Buněčné linie, bakteriální kmeny a viry .....	40
4.9	Sterilizace.....	40

4.10	Práce s bakteriemi .....	40
4.10.1	Kultivace bakterií.....	40
4.10.2	Příprava chemicky kompetentních buněk pro transformaci tepelným šokem....	40
4.10.3	Transformace tepelným šokem.....	41
4.10.4	Skladování bakterií .....	41
4.11	Práce s tkáňovými kulturami.....	41
4.11.1	Pasážování savčích buněk linie 3T6 .....	41
4.11.2	Transfekce savčích buněk – nukleofekce Amaxa.....	42
4.11.3	Transfekce savčích buněk TurboFectem .....	42
4.11.4	Fixace a permeabilizace buněk na mikroskopických sklíčkách .....	43
4.11.5	Imunofluorescenční značení proteinů v buňkách .....	43
4.11.6	Měření cytotoxicity.....	43
4.11.7	Infekce savčích buněk virem .....	44
4.12	Izolace myšího polyomaviru .....	44
4.12.1	Centrifugace přes sacharózový polštář .....	45
4.12.2	Izopyknická centrifugace v rovnovážném gradientu CsCl.....	45
4.12.3	Dialýza .....	45
4.12.4	Hemaglutinace .....	46
4.12.5	Určení infekčního titru viru v kultuře myších fibroblastů .....	47
4.13	Elektronová mikroskopie .....	47
4.13.1	Negativní barvení.....	47
4.14	Práce s DNA.....	47
4.14.1	Minipreparace plazmidové DNA.....	47
4.14.2	Štěpení DNA restrikčními endonuklázami .....	48
4.14.3	Agarózová elektroforéza.....	48
4.14.4	Maxipreparace plazmidové DNA zbavené endotoxinů pro transfekci savčích buněk .....	49
4.15	Imobilizace proteinů na membráně.....	49
4.15.1	Dot Blot.....	49
4.15.2	Imunologická detekce proteinů imobilizovaných na membráně .....	49
5	Výsledky.....	51

5.1	Izolace myšího polyomaviru .....	52
5.1.1	První izolace .....	52
5.1.2	Druhá izolace .....	55
5.2	Vliv inhibitorů retrográdního transportu na infekci myším polyomavirem.....	58
5.2.1	Cytotoxicita inhibitorů .....	58
5.2.2	Vliv Golgicidu A (GCA) na infekci MPyV .....	60
5.2.3	Vliv Brefeldinu A (BFA) na infekci MPyV .....	66
5.3	Studium kolokalizací MPyV s markery retrográdního transportu .....	70
5.4	Zkoumání účasti GTPázy Rab 9 na produktivním transportu MPyV .....	79
5.4.1	Izolace plazmidů pro transfekce savčích buněk .....	79
5.4.2	Transfekce.....	81
5.4.3	Transfekce a infekce .....	81
5.4.4	Optimalizace transfekce.....	84
5.4.5	Transfekce a infekce 2 .....	86
6	Diskuze .....	89
6.1	Vliv inhibitorů retrográdního transportu na infekci MPyV .....	90
6.2	Studium kolokalizací MPyV s markery retrográdního transportu .....	92
6.3	Zkoumání účasti GTPázy Rab 9 na produktivním transportu MPyV .....	94
7	Souhrn.....	97
8	Seznam použité literatury .....	99

## Seznam zkratk

Arf	„ADP ribosylation factor“; ADP ribozylační faktor
BFA	Brefeldin A
BiP	„Binding immunoglobulin protein“
BKV	BK (polyoma) virus
bp	Páry bazí
BSA	Bovinní sérum albumin
CI-MPR	Manóza-6-fosfátové receptory nezávislé na kationtech („Cationt independent“)
CMV	Cytomegalovirus
DAPI	4,6-diamidino-2-fenylindol
dH <sub>2</sub> O	Destilovaná voda
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagle Medium“
DN	Dominantně negativní mutanta
EDTA	Kyselina ethylendiaminotetraoctová
EEA1	„Early endosome antigen 1“
EGFP	„(Enhanced) green fluorescent protein“; zelený fluorescenční protein
ENH	Enhancer
ER	Endoplazmatické retikulum
ERAD	„Endoplasmic reticulum associated degradation“
FBS	Fetální bovinní sérum
Ffu	„Fluorescence forming unit“
GA	Golgiho aparát
GAP	„GTPase activating protein“
GBF1	„Golgi Brefeldin resistance factor 1“
GCA	Golgicid A
GEF	Guanosin nucleotide exchange factor
HA	Hemaglutinin
HAU	Hemaglutinační jednotky
hpi	Hodiny po infekci
hpt	Hodiny po transfekci
HPV16	Lidský papillomavirus 16

HPyV	Lidský polyomavirus
IF	Imunofluorescence
JCV	JC (polyoma) virus
KI	Karolinska Institute (virus)
LB	Luria-Bertani (médium)
LDH	Laktátdehydrogenáza
LT	Velký („large“) T antigen
MCPyV	Polyomavirus karcinomu Merkelových buněk
moi	Multiplicita infekce
MOPS	Kyselina 3-(N-morfolinyl)-propansulfonová
MPR	Manóza-6-fosfát receptor
MPyV	Myší polyomavirus
MT	Střední („middle“) T antigen
MWPyV	Malawi polyomavirus
NE	„Nuclear envelope“; jaderná membrána
NeuNAc	N-acetylneuraminová kyselina
NJPyV	New Jersey polyomavirus
NLS	„Nuclear localization signal“; jaderný lokalizační signál
NPC	„Nuclear pore complex“; komplex jaderného póru
NT	„Non-treated“; neošetřené (inhibitorem)
Ori	Počátek („origin“) replikace DNA
PBS	„Phosphate buffered saline“; fosfátový pufr
PDI	Protein disulfid izomeráza
pfu	„Plaque forming unit“
PI3K	Fosfatidilinositol-3 kináza
PLCy1	Fosfolipáza Cy1
PML-NBs	„Promyelotic leukemia nuclear bodies“
PP2A	Protein fosfatáza 2A
pRb	Retinoblastomový protein
PyV	Polyomavirus
RPM	Otáčky za minutu
RPMI	„Roswell Park Memorial Institute“ (médium)
SA	Sialová kyselina

SNARE	„Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor“
SNX	Třídící („sorting“) nexin
ST	Malý („small“) T antigen
STLPyV	Saint Louis polyomavirus
STX	Syntaxin
SV40	„Simian (vacuolating) virus 40“
TBE	Tris-borátový-EDTA pufr
TE pufr	Tris-EDTA pufr
TGN	„ <i>trans</i> Golgi network“; <i>trans</i> -Golgi síťovina
TSPyV	„Trichodysplasia spinulosa polyomavirus“
VAMP	„Vesicle-associated membrane protein“
VP1, VP2, VP3	Virový (kapsidový) protein 1-3
Vps	„Vacuolar protein sorting“
wt	„wild type“; divoký typ
WU	Washington university (virus)



## **1 Úvod**

Polyomaviry jsou malé neobalené DNA viry. Vzhledem k velikosti jejich genomu mohou kódovat jen nezbytné geny pro svou replikaci. Jejich proteiny jsou multifunkční a vznikají díky alternativnímu sestřihu.

Polyomaviry působí jako patogeny pro zvířata i lidi. Naprostá většina infekcí je subklinická, avšak polyomaviry ustavují dlouhodobou persistenci. Velká část populace (jak lidské, tak zvířecí) je těmito viry promořena. Tato možnost koexistence s hostitelem z nich činí jedny z evolučně nejúspěšnějších virů. Ovšem u imunosuprimovaných jedinců (například po transplantacích nebo vlivem jiného onemocnění) může dojít k reaktivaci infekce a závažnému onemocnění. Je též znám onkogenní potenciál těchto virů. U zvířat jsou schopné způsobovat různé nádory. Jako zatím jediný virus této čeledi způsobující nádory u lidí, byl identifikován virus karcinomu Merkelových buněk. S postupem výzkumu polyomavirů je pravděpodobné nalezení jejich asociace s dalšími typy nádorů.

Patogenita polyomavirů u lidí z nich činí důležitý objekt zájmu pro výzkum. Základní výzkum modelového viru myšího polyomaviru (MPyV) je důležitý nejen z hlediska virologie, ale též molekulární a buněčné biologie obecně. Studium transportu polyomavirů v buňce přispívá k pochopení vlastností viru i vezikulárního transportu. Poruchy tohoto transportu jsou rovněž spojeny s onemocněními. Dále je znalost buněčného transportu důležitá pro navrhování vektorů založených na kapsidách neobalených virů pro doručení nákladu (terapeutických molekul, proteinů či DNA) do buněk. Výzkum transportu myšího polyomaviru do buněčného jádra a vývoj polyomavirům podobných částic patří k dlouhodobým cílům naší laboratoře.

## **2 Literární přehled**

## 2.1 Polyomaviry

Polyomaviry jsou malé neobalené viry. Jejich genomem je kruhová dvouvláknová DNA. Hlavní skupinou hostitelů jsou savci a ptáci. Nově byl dokonce objeven i u ryb (Peretti et al. 2015). Do dnešního dne bylo nalezeno a uznáno mezinárodní komisí pro taxonomii virů (ICTV) 76 druhů polyomavirů, z toho 13 lidských (Calvignac-Spencer et al. 2016).

Jako první z čeledi *Polyomaviridae* byl v roce 1953 objeven myší polyomavirus (MPyV). (Gross 1953). U nově narozených a imunosuprimovaných myší vyvolával mnohočetné nádory. Odtud název polyomavirus, z řeckého *poly* – mnoho a *oma* – nádor. Další polyomavirus byl popsán v roce 1960. Jednalo se o virus SV40 (simian vacuolating virus 40), který kontaminoval polio vakcínu (Sweet & Hilleman 1960). Tyto dva viry slouží jako modely pro tuto čeleď a jsou nejvíce prozkoumány.

Nejdéle známé lidské polyomaviry byly popsány roku 1971 – BK virus (Gardner et al. 1971) a JC virus (Padgett et al. 1971). Tyto viry jsou v populaci vysoce rozšířené (Kean et al. 2009), u zdravých jedinců většinou asymptomatické, ustavují latentní infekci. U imunosuprimovaných jedinců, v důsledku transplantací nebo některých onemocnění, nastává problém při jejich reaktivaci. JC virus u těchto pacientů způsobuje vážné poškození mozku demyelinizací neuronů – progresivní multifokální leukoencefalopatii (Adang & Berger 2015). Nefropatie způsobené reaktivací BK viru jsou nejčastější příčinou neúspěchu při transplantaci ledviny (Jamboti 2016).

Do roku 2000 byly polyomaviry řazeny spolu s papillomaviry do společné čeledi *Papovaviridae*, kdy došlo k jejich rozdělení vzhledem k jejich odlišné replikační strategii a sekvenční nepříbuznosti.

V roce 2007 byly objeveny lidské viry WU (Washington University) (Gaynor et al. 2007) a KI (Karolinska Institute) (Allander et al. 2007). U dětí a imunosuprimovaných pacientů způsobují akutní infekce respiračního traktu. Další objevený, TSPyV (Trichodysplasia spinulosa associated polyomavirus; HPyV 8), u imunosuprimovaných způsobuje vzácné kožní onemocnění trichodysplasia spinulosa. (van der Meijden et al. 2010)

V posledních letech dochází k dalším objevům lidských polyomavirů, přičemž u nich zatím nejsou známé spojitosti s onemocněními. HPyV 6 (lidský polyomavirus 6) a HPyV 7 se nacházely v kůži (Schowalter et al. 2010), HPyV 9 v séru a kůži (Scuda et al. 2011). MWPyV (HPyV 10), pojmenovaný podle objevu v Malawi, se nacházel ve stolici a kůži (Siebrasse et

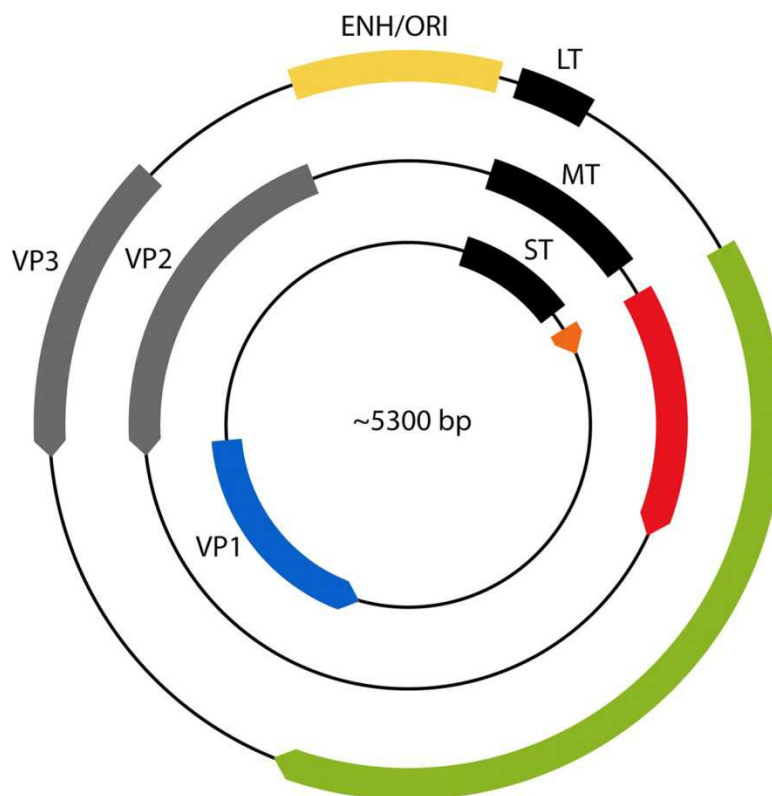
al. 2012). Tamtéž byl objeven STLPyV (Saint Louis polyomavirus; HPyV 11) (Lim et al. 2013). HPyV 12 byl nalezen v gastrointestinálním traktu (Korup et al. 2013). V souvislosti s případem u pacientky po transplantaci byl popsán New Jersey polyomavirus (NJPyV; HPyV 13), s možným tropismem k vaskulárním buňkám endotelu (Mishra et al. 2014).

Už od objevu prvních polyomavirů byl známý jejich onkogenní potenciál u zvířat. Tato vlastnost souvisí zejména se stimulací buňky do S-fáze, vyvazováním onkosupresorů p53 a pRb, a též aktivací některých signálních drah. Onkogenní potenciál je často spojený s integrací do genomu hostitele. Jako zatím jediným potvrzeným polyomavirem asociovaným s lidskými nádory je polyomavirus karcinomu Merkelových buněk (MCPyV) (Feng et al. 2008). Tento kožní karcinom je agresivní, ale relativně vzácný, s výskytem u starších a imunosuprimovaných pacientů. Dalším možným, ale dosud nepotvrzeným kandidátem je BK virus u nádorů prostaty, močového měchýře a ledvin. Může fungovat jako kofaktor při rozvoji nádoru spolu s aktivací některých onkogenů. Avšak přímá spojitost samostatného působení nebyla dosud uspokojivě prokázána, přičemž existují důkazy pro i proti (Abend et al. 2009).

## **2.2 Myší polyomavirus**

### **2.2.1 Genom**

Myší polyomavirus má jako genom kruhovou, kovalentně uzavřenou dvouvláknovou DNA o velikosti asi 5,3 kbp (Obr. 2.1). Obsahuje několik oblastí – regulační, časnou a pozdní. V regulační oblasti se nachází virový počátek replikace (ori) a v jeho blízkosti promotory časných a pozdních genů a transkripční enhancery. Časná transkripce (geny pro regulační nestrukturní proteiny) běží po vstupu virového genomu do buněčného jádra, ale pokračuje i v pozdní fázi. Časné produkty (antigeny) deregulují buněčné procesy, zajišťují směřování buňky do S-fáze buněčného cyklu a pomáhají replikaci virové DNA. Pozdní produkty (antigeny) jsou virové strukturní proteiny, ze kterých se skládá kapsida. K jejich expresi dochází v pozdní fázi infekce z pozdní oblasti, po zahájení replikace virové DNA. Časná a pozdní transkripce probíhá protisměrně z opačných řetězců DNA.

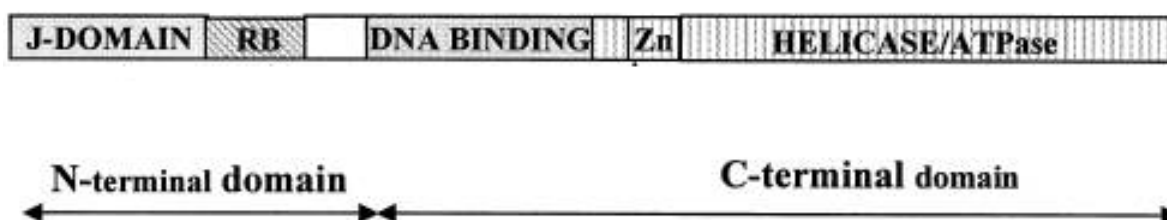


**Obr. 2.1:** Mapa genomu myšího polyomaviru. Časná oblast je po směru hodinových ručiček. Vyznačeny jsou kódující oblasti časných antigenů (LT, MT, ST). Pozdní oblast kódující proteiny VP1, VP2 a VP3 je proti směru hodinových ručiček. Odlišné barvy značí odlišné čtecí rámce. Dále je vyznačena nekódující regulační oblast s počátkem replikace a enhancery (enh/ori). Upraveno podle (Fluck & Schaffhausen 2009).

### 2.2.2 Časné produkty

Časná oblast genomu myšího polyomaviru kóduje 3 proteiny – malý, střední a velký T antigen. Slouží, mimo jiné, k navození stavu buňky vhodného pro replikaci a též interagují s replikačním aparátem virové DNA. Pro své deregulační vlastnosti mají potenciál transformovat buňky, dostaly název tumorogenní (T) antigeny. Časná transkripce probíhá pomocí buněčné RNA polymerázy II. Z jediného promotoru je přepisována celá časná oblast. Tento jeden primární transkript je upravován pomocí alternativního sestřihu do 3 mRNA. Z nich jsou translatovány virové antigeny – malý (small T, ST), střední (middle T, MT) a velký (large T, LT) T antigen. Všechny mají společnou N-koncovou doménu, C-konec mají odlišný. LT je možno detekovat v infikovaných buňkách metodou Western blot po 6-8 hpi (hodinách po infekci), ST a MT po 16-18 hpi (Chen & Fluck 2001).

Velký T antigen (LT) je multifunkční protein o velikosti asi 88 kDa. Je esenciální pro replikaci polyomavirů. Skládá se z několika konzervovaných domén, viz obr. 2.2. Na společném N-konci pro všechny T antigeny MPyV se nachází J-doména, která je homologická s DnaJ chaperony. Tato doména váže buněčný chaperon Hsc70. Vyvazování onkosupresoru pRb (retinoblastomový protein) další LT doménou vede k uvolnění transkripčního faktoru E2F z komplexu s pRb. Na E2F závislá transkripce vede k navození S-fáze (Nemethova et al. 2004). Toto může vést k buněčné immortalizaci, avšak transformaci buňky je zabráněno aktivací proteinu p53 (Lowe et al. 1994). LT antigen viru SV40 navíc inaktivuje i p53, tudíž je tento protein schopen transformovat buňku samostatně. LT antigen MPyV tuto schopnost postrádá, samostatně je tedy schopen pouze buňky immortalizovat. Transformaci je schopen způsobit pouze v součinnosti s dalšími T antigeny. LT pomáhá zahajovat replikaci vazbou DNA vazebné domény na počátek (origin) replikace virového genomu. Při vazbě DNA dochází k hexamerizaci LT antigenu a pomocí helikázové/ATPázové aktivity dochází k rozvolnění DNA a vytvoření replikační bubliny. LT antigen interaguje též s některými proteiny replikační mašinerie.



**Obr. 2.2:** Rozložení domén velkého T (LT) antigenu myšího polyomaviru. Od N-konce: J-doména vázající cheperony, pRb vazebná doména, DNA vazebná doména, Zn vazebná a helikázová/ATPázová doména na C-konci. Upraveno podle (Nemethova et al. 2004)

Střední T antigen je membránový protein bez vlastní enzymové aktivity o velikosti asi 49 kDa. Je zakotven v membráně pomocí domény na C-konci. Kóduje ho MPyV a některé příbuzné viry. Primátí polyomaviry MT antigen nekódují. MT antigen funguje jako hlavní onkogen MPyV díky interakcím s komponentami některých buněčných signálních drah. MT antigen váže protein fosfatázu 2A (PP2A) a interaguje s rodinou protein tyrozin kináz c-Src. Fosforylovaný MT váže fosfatidylinositol-3-kinázu PI3K, fosfolipázu C $\gamma$ 1 (PLC $\gamma$ 1) a adaptorové proteiny Shc/Grb2 (Cheng et al. 2009). Aktivací Src kinázy nepřímo inaktivuje protein p53 (Gottlieb & Villarreal 2001). MT vykonává funkci jako konstitutivně aktivovaný

buněčný receptor asociovaný s tyrozin kinázami. Tím dochází k aktivaci signalizačních drah vedoucí k navození stavu vhodného pro replikaci viru, ale mohou vést i k buněčné transformaci (Cheng et al. 2009).

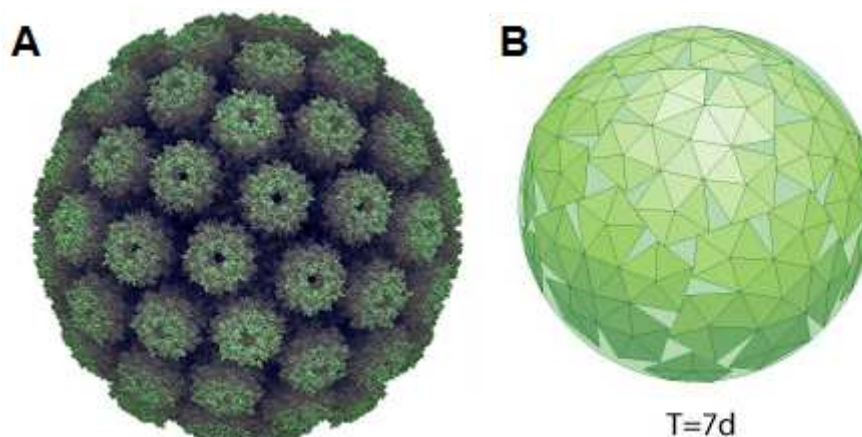
Malý T antigen je solubilní protein o velikosti asi 22 kDa. Jeho hlavní funkcí je inhibiční interakce s PP2A (Yang et al. 1991). Inhibice fosfatázy vede k aktivaci signálních drah stimulující vstup do S-fáze a progresi buněčného cyklu. Spolu s MT antigenem vytváří vhodné prostředí pro replikaci viru, přičemž plné transformace lze dosáhnout spoluprací všech 3 antigenů.

### **2.2.3 Pozdní produkty, struktura kapsidy**

Pozdní oblast genomu myšího polyomaviru kóduje tři strukturní proteiny. Hlavní kapsidový protein VP1 (43 kDa) a minoritní kapsidové proteiny VP2 (35 kDa) a VP3 (23 kDa). Jejich exprese je zahájena v souvislosti s replikací virové DNA. Jednotlivé varianty mRNA vznikají díky alternativnímu sestřihu. Protein VP1 je kódován v jiném čtecím rámci, než VP2/3. VP1 se objevuje v infikované buňce po 22 hpi, přičemž po 6 hodinách exprese přesáhne množství VP1 hladinu časných antigenů (Chen & Fluck 2001).

Kapsida myšího polyomaviru je malá (o velikosti asi 45 nm), neobalená a má ikosahedrální symetrii (triangulační číslo  $T=7$ ) (obr. 2.3). Protein VP1 se skládá do pentamerů (kapsomer), přičemž 72 těchto kapsomer tvoří kapsidu (celkově 360 molekul VP1). Kapsomery se vážou mezi sebou, z čehož 12 je pentavalentních a 60 je hexavalentních. Pentamery VP1 mají kruhovou strukturu s centrální prohlubní, ve které je zakotvena hydrofobními interakcemi jedna molekula proteinu VP2 nebo VP3, viz obrázek 2.4 (Barouch & Harrison 1994). Pentamery mezi sebou interagují pomocí C-koncové flexibilní části proteinu VP1. Ta asociuje s N-koncovou částí proteinu VP1 sousedního pentameru. (Liddington et al. 1991; Stehle et al. 1994). Kapsida je navíc stabilizována pomocí  $\text{Ca}^{2+}$  iontů. (Brady et al. 1977). V rámci jednoho pentameru i mezi pentamerami jsou disulfidové vazby (Stehle & Harrison 1997; Stehle & Harrison 1996a; Walczak & Tsai 2011).



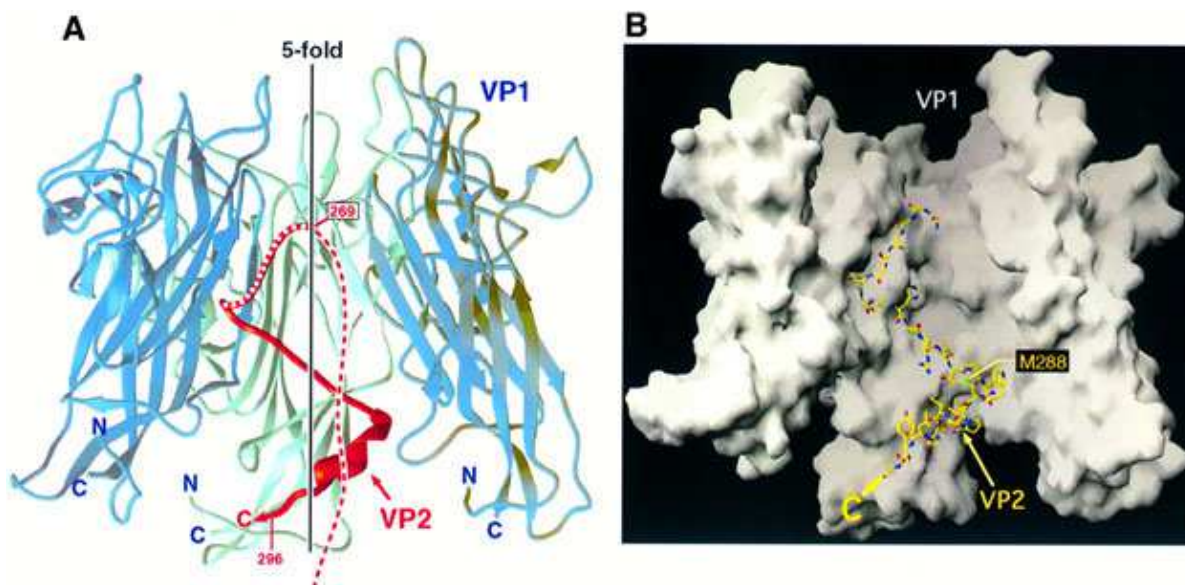


**Obr. 2.3:** Model struktury kapsidy MPyV (A) Napravo (B) je znázorněna ikosahedrál ní symetrie kapsidy při triangulačn ím čísle  $T=7$ . (A) Upraveno podle <http://www.virology.wisc.edu/virusworld> (struktura podle (Stehle & Harrison 1996b)). (B) Upraveno podle <http://viralzone.expasy.org/>.

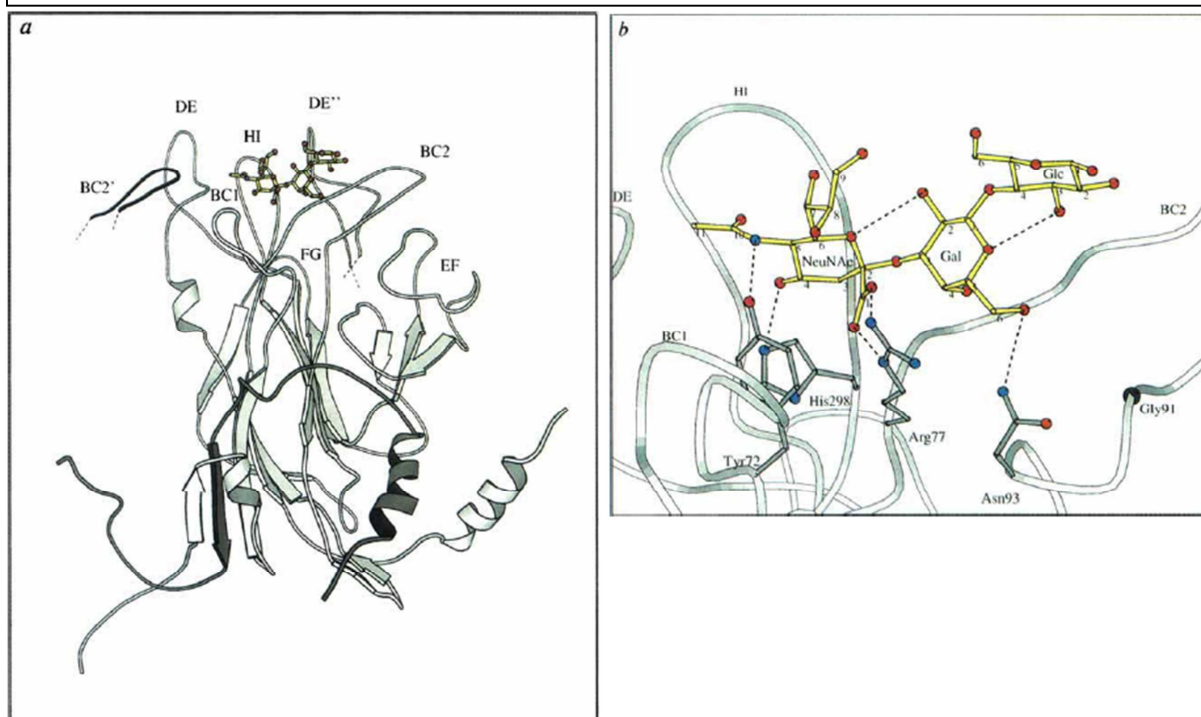
Virový minichromozom je namotán na oktameru buněčných histonů H2A, H2B, H3 a H4. Tvoří strukturu podobnou chromatinu o velikosti asi 20 nukleozomů (Crémisi et al. 1976; Christiansen et al. 1977; Winston et al. 1980). Neobsahuje histon H1, jeho funkci vykonává protein VP1 (Moreland et al. 1991).

Protein VP1 je schopen se za vhodných podmínek (iontová síla, koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ ) samouspořádat do prázdných virových kapsid (virus-like particles, VLPs), s minoritními proteiny, i bez nich (Montross et al. 1991; Salunke et al. 1986).

N-koncová doména hlavního kapsidového proteinu VP1 má nespecifickou DNA vazebnou aktivitu (Moreland et al. 1991). Tato doména se překrývá s jaderným lokalizačním signálem (NLS) (Chang et al. 1992b; Moreland & Garcea 1991). Centrální část je tvořena  $\beta$ -strukturami propojenými šesti smyčkami a několika krátkými  $\alpha$ -helixy (Liddington et al. 1991). Čtyři smyčky jsou exponované na povrchu – nazývají se BC, DE a HI. Přičemž smyčky BC a HI interagují s receptorem na povrchu buňky (viz obrázek 2.5) (Stehle & Harrison 1996b; Stehle et al. 1994). C-konec se sestává z již zmíněného volného ramene interagujícího s okolními pentamery.

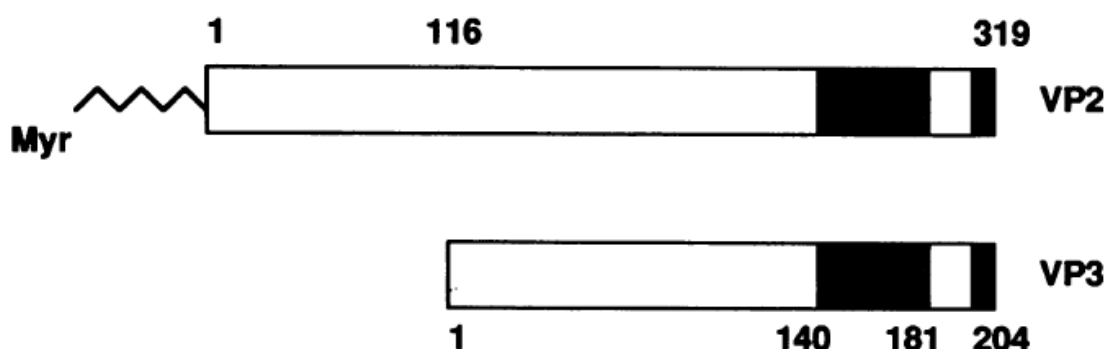


**Obr. 2.4:** Struktura komplexu VP1 a VP2/3. (A) Průřez pentamerem VP1 (odstíny modré) s interagujícím proteinem VP2 (červeně). Část proteinu VP2 označena přerušovanou čarou nemohla být přesně krystalograficky určena (zbytky 269-278). Nejsou zobrazeny 2 přední molekuly VP1. (B) Tentýž model s ukázaným povrchem proteinu VP1. Převzato z (Chen et al. 1998).



**Obr. 2.5.** Povrchové smyčky proteinu VP1. (a) Schematický náčrt monomeru VP1 v komplexu se sialyl laktózou (analog receptoru). (b) Přiblížení vazebného místa na receptor. Jsou znázorněny interakce mezi smyčkami VP1 a receptorem. Převzato z (Stehle et al. 1994).

Protein VP3 je zkrácenou verzí VP2. Oba proteiny sdílejí asi 2/3 své délky od C-konce. Translace probíhá z jiného iniciačního kodonu ve stejném čtecím rámci. Protein VP2 obsahuje navíc N-koncovou doménu. Tato doména je myristylovaná na N-koncovém glycinu (Streuli & Griffin 1987). Porovnání proteinů VP2 a VP3 je na obrázku 2.6. Oba minoritní kapsidové proteiny na svém C-konci obsahují NLS (Chang et al. 1992a). Syntéza strukturních proteinů probíhá v cytoplazmě, následně jsou importovány v komplexech pentamer VP1 a spolu s jedním z minoritních proteinů VP2 nebo VP3 do jádra, kde probíhá morfogeneze virionů (Clever & Kasamatsu 1991; Forstova et al. 1993). Strukturní minoritní proteiny MPyV nevážou DNA (Chang et al. 1993). Ale jejich homology u některých dalších polyomavirů (SV40, JCV, BKV) mají nespecifickou DNA vazebnou aktivitu (Clever et al. 1993). Jsou nezbytné pro infektivitu viru, hrají roli při uvolnění z ER a vstupu viru do jádra (viz kapitoly 2.3.3 a 2.3.4).



**Obr. 2.6.** Srovnání sekvence VP2 a VP3. VP2 má myristylovanou unikátní N-koncovou doménu (1-116). Střední část (140-181 u VP3) je u obou proteinů zodpovědná za interakci s proteinem VP1. Na C-konci obou minoritních proteinů se nachází NLS. Upraveno podle (Barouch & Harrison 1994).

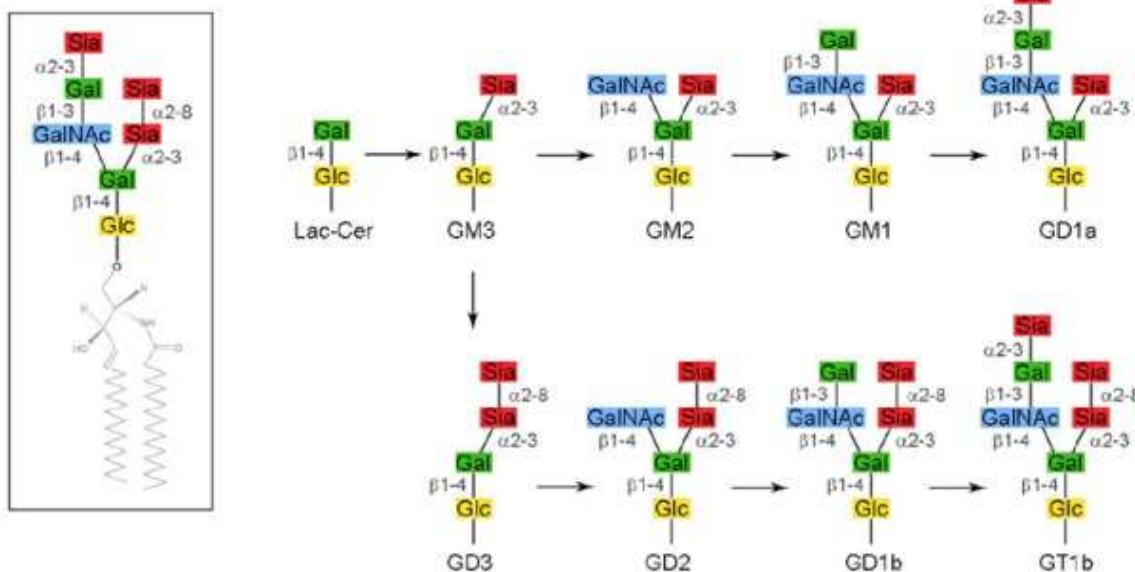
## **2.3 Transport polyomavirů v buňce**

Infekční cyklus polyomavirů se skládá z několika kroků. Nejprve dojde k zachycení na buněčném povrchu, vstupu endocytózou a transportu směrem k jádru. Následuje částečné rozvolnění kapsidy a import virového genomu do jádra. Dochází k expresi časných regulačních antigenů, transportu LT do jádra a posléze k replikaci virové DNA. Po zahájení genomové replikace se exprimují pozdní geny a strukturní proteiny a jsou transportovány do jádra. Posledním krokem je morfogeneze nových virionů v jádře, smrt buňky a uvolnění virového potomstva.

### **2.3.1 Vstup do hostitelské buňky**

Polyomaviry, jakožto neobalené viry vstupují do buněk receptorem zprostředkovanou endocytózou. Tento děj se skládá z několika kroků. Nejprve musí dojít k interakci viru se specifickým receptorem na povrchu buňky. Vazbou na receptor je aktivována signální dráha, která vede k reorganizaci aktinu pod buněčnou membránou. Následně je virová částice endocytována do membránového váčku.

Mezi hlavní receptory polyomavirů patří gangliosidy - glykosfingolipidy (ceramidy s oligosacharidem) s navázaným zbytkem kyseliny sialové (SA, sialic acid nebo též NeuNAc, N-acetylneuraminová). Jejich schematická struktura je na obr. 2.6. Gangliosidy se na buněčném povrchu vyskytují obvykle v oblastech lipidových raftů. Lipidové rafty jsou dynamické membránové mikrodomény, bohaté na glykosfingolipidy, a také cholesterol a caveolin (Simons & Ikonen 1997; Harder & Simons 1997). Hlavní kapsidový protein VP1 myšího polyomaviru váže kyselinu sialovou na buněčném povrchu. (Fried et al. 1981; Cahan et al. 1983). Za vazebnou specifitu k SA jsou zodpovědné jeho smyčky (Stehle et al. 1994; Stehle & Harrison 1996a).



**Obr. 2.6** Schéma struktury gangliosidů. Gangliosidy jsou glykosfingolipidy s navázanou kyselinou sialovou. GD1a a GT1b jsou receptory pro MPyV. Sia – kyselina sialová, Gal – galaktóza, GalNAc – N-acetylgalaktosamin, Glc – glukóza. Převzato ze stránky [www.functionalglycomics.org](http://www.functionalglycomics.org).

Receptorem MPyV jsou gangliosidy GD1a GT1b (Qian & Tsai 2010; Tsai et al. 2003). Roli koreceptoru MPyV hrají glykosylované integriny  $\alpha 4 \beta 1$ , které také obsahují kyselinu sialovou. (Caruso et al. 2003). DE a EF smyčky proteinu VP1 obsahují vazebné motivy pro integrin. Tyto motivy byly nalezeny i u minoritního proteinu VP2 MPyV v jeho N-koncové doméně (Caruso et al. 2003). U viru po navázání na receptor obsahující SA pravděpodobně dochází ke konformační změně kapsidy, která umožní navázání na koreceptor. Tento model změny konformace podporuje i zjištění, že *in vitro* vazba virionů na fragmenty receptorů zvyšuje odolnost proteinů VP1 i VP2 a VP3 vůči proteázám (Cavaldesi et al. 2004). Ostatní polyomaviry mají jako receptory jiné gangliosidy. Jako koreceptory, pokud jsou známy, využívají různé glykoproteiny. Shrnutí v (Taube et al. 2010).

Většina polyomavirů při endocytóze nevyužívá ani clathrin, ani caveolin. Výjimkou je JCV, který využívá clathrinové váčky (Pho et al. 2000). MPyV vstupuje do buňky hladkými monopinocytickými váčky. Vzhledem k tomu, že vstupuje v oblastech membránových raftů, vykazovaly tyto váčky v některých buněčných liniích kolokalizaci s caveolinem-1. Z těchto kolokalizací se usuzovalo, že využívají endocytózu závislou na caveolinu (Gilbert & Benjamin 2004; Richterová et al. 2001). Exprese dominantně negativní mutanty caveolinu-1 nesnížila produktivní infekci MPyV a k internalizaci viru docházelo účinně i u buněčné linie

Jurkat, ve které není produkován caveolin. Též byla ukázána nezávislost na clathrinu (Liebl et al. 2006b).

Při vstupu MPyV do buňky dochází k dočasnému přeskupení kortikálního aktinu pod plazmatickou membránou. Internalizace viru je doprovázena dočasnou ztrátou organizace aktinových stresových vláken (Richterová et al. 2001). Uměle vyvolaná stabilizace (pomocí jasplakinolidu) aktinu měla za následek snížení infekivity viru. Naopak při destabilizaci aktinu (pomocí latrunculinu A a cytochalasinu B) byl MPyV několikanásobně infektivnější (Gilbert et al. 2003). Naopak virus SV40 potřebuje pro svoji internalizaci dynamickou aktinovou síť. Destabilizace i stabilizace aktinových mikrofilament inhibovala jeho infektivitu a vstup (Ewers et al. 2010; Pelkmans et al. 2002).

### **2.3.2 Transport z endozomů do ER**

Pro úspěšnou infekci je nutné, aby polyomavirus z endocytovaného kompartmentu dopravil svou genetickou informaci do jádra a přitom se vyhnul degradačním drahám (směrování do lysozomu). Mnoho virů opouští endozomální systém, poté co v kyselém prostředí dojde k vystavení viroporinu, nebo fúzogenního peptidu u obalených virů a úniku do cytosolu. Polyomaviry na své cestě k jádru jsou transportovány až do ER, odkud se do jádra dostávají zatím ne dostatečně prozkoumaným mechanismem.

Transport MPyV je po endocytóze regulován pomocí GTPáz Rab5 a Rab7, zodpovědných za transport do časných endozomů a posléze jejich maturaci (Qian et al. 2009). Časné endozomy jsou typické přítomností Rab5, během jejich maturace na pozdní endozomy dochází k výměně za Rab 7 (Rink et al. 2005). Dominantně negativní mutanty těchto GTPáz snižovaly infektivitu viru (Liebl et al. 2006b; Zila et al. 2014; Qian et al. 2009). I virus SV40 putuje pozdními endozomy, byla zjištěna závislost na výměně Rab5 za Rab 7 (Engel et al. 2011). Virus je dále směrován z pozdních endozoů do ER, aby se vyhnul lysozomální degradaci (Qian & Tsai 2010; Qian et al. 2009).

Pro infekci je důležitý průchod endozomálními kompartmenty s nízkým pH. Inhibice ATPáz pro transport  $H^+$  iontů (Bafilomycin A) nebo neutralizace pH ( $NH_4Cl$ ) endozomů inhibovaly infektivitu, MPyV zůstával v časných endozomech (Liebl et al. 2006a). Díky kyselému pH může dojít ke strukturním změnám kapsidy, která může souviset s jejím rozvolněním v ER a následným únikem z ER a transportem do jádra (Qian et al. 2009).

Byla nalezena kolokalizace mezi MPyV a recyklujícími endozomy (subpopulace časných endozomů pozitivních na Rab 11). Předpokládalo se, že je odtud transportován do ER, avšak nebyla nalezena kolokalizace s GTPázou řídící tuto dráhu, Rab6 (Liebl et al. 2006a; Mannová & Forstová 2003). V další studii bylo ukázáno, že MPyV do recyklujících endozomů vstupuje, ovšem tato lokalizace viru není důležitá pro produktivní infekci (Zila et al. 2014).

Transport MPyV do ER je řízený pomocí vazby na gangliosidový receptor GD1a přes pozdní endozomy. Fluorescenční částice (o průměru 20 nm) s navázanými protilátkami proti GD1a, přes které byla navázaná na gangliosid, byla též specificky dopravena do ER (Qian & Tsai 2010; Qian et al. 2009).

Jako nástroj pro studium retrográdního transportu je používán inhibitor Brefeldin A (BFA). BFA inhibuje protein GBF1, který slouží jako GEF (guanine nucleotide exchange factor) GTPázy Arf (ADP-ribosylation factor 1; ADP-ribosylační faktor 1), která je zodpovědná za formování COPI váčků. Inhibicí GBF1 je tedy inhibována GTPáza Arf, a tím i transport pomocí COPI váčků. Tyto váčky jsou využívány pro retrográdní transport z Golgiho aparátu (GA) do ER. (Donaldson et al. 1992; García-Mata et al. 2003).

Při testování vlivu BFA na infekci MPyV bylo nejprve zjištěno, že nemá na efektivní transport vliv, pouze infekci zpomaloval (Mannová & Forstová 2003). Ovšem v jiné studii došli k opačnému závěru a to, že BFA infekci MPyV inhibuje (Gilbert & Benjamin 2004). U viru SV40 byla prokázána inhibice infekce pomocí BFA (Norkin et al. 2002; Mannová & Forstová 2003). Zároveň SV40 kolokalizuje s markerem COPI váčků,  $\beta$ COP (Norkin et al. 2002). Jak MPyV, tak SV40 nikdy nebyly pozorovány v GA. Avšak nebylo zkoumáno, jestli MPyV prochází *trans*-Golgi sítí (TGN). Zatím jediná studie na SV40 ukázala pomocí elektronové mikroskopie, že SV40 TGN neprochází (Engel et al. 2011). Transport virů BK i JC je též inhibovaný pomocí BFA (Querbes et al. 2006; Low et al. 2006). Ovšem vliv BFA na endozomální systém je širší. Dochází k tvorbě tubulárních útvarů fúzí endosomů, TGN a lysozomů (Lippincott-Schwartz et al. 1991; Tooze 1992). Zajímavé by bylo zjistit efekt novějšího inhibitoru, Golgicidu A (Sáenz et al. 2009). Je to vysoce specifický, reverzibilní inhibitor *cis*-Golgi ArfGEF, GBF1. Ten má kromě zablokování COPI transportu za následek i rozrušení struktury jak GA, tak i TGN. Na rozdíl od BFA nemá efekt na celý endozomální systém.

Jak u MPyV, tak u ostatních polyomavirů (SV40, BKV, JCV) jsou důležité mikrotubuly pro jejich transport do ER. Rozrušením jejich struktury depolymerizačními látkami (colcemid,

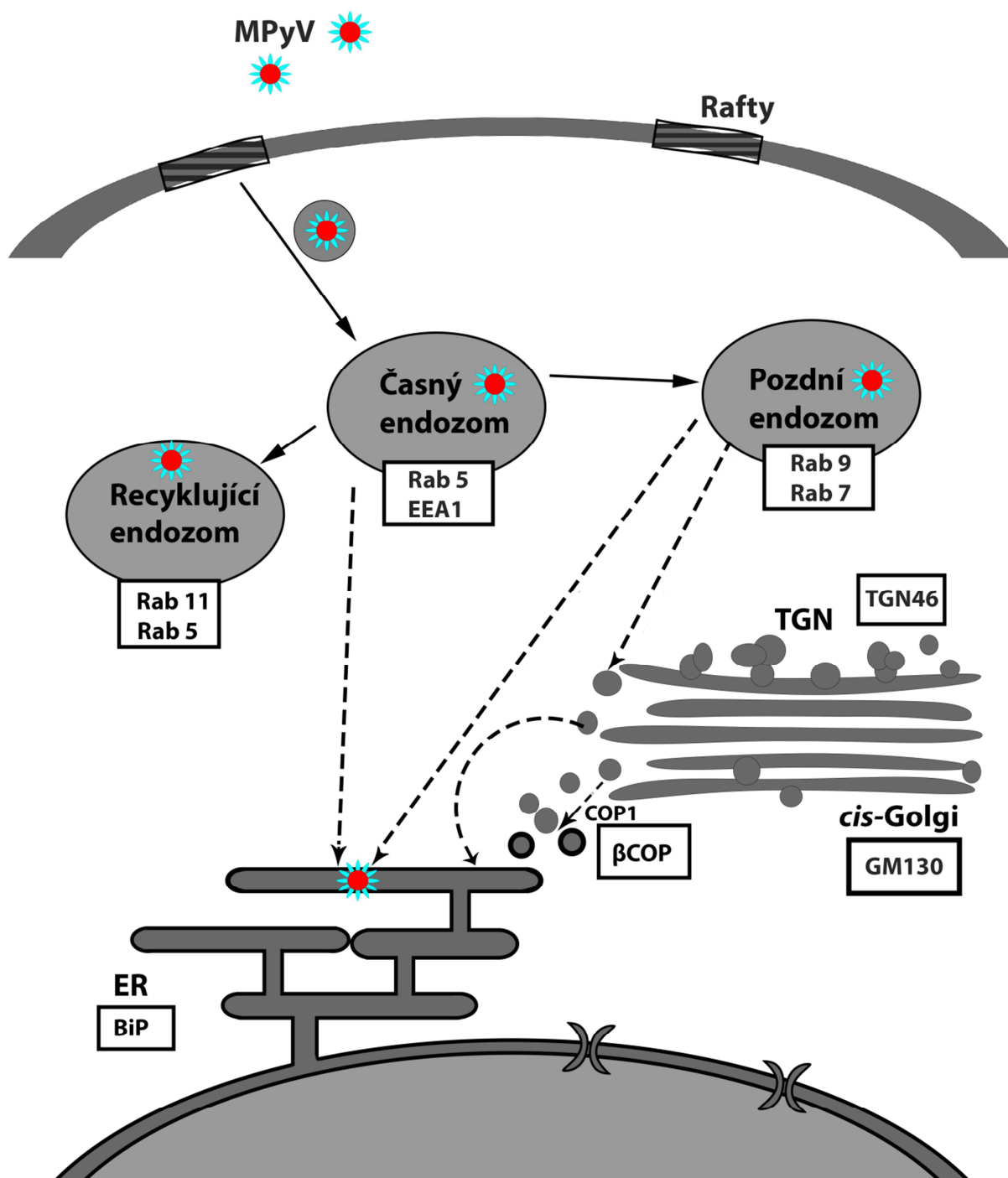
nocodazol) má za následek inhibici infekce (Jiang et al. 2009; Moriyama & Sorokin 2008; Damm et al. 2005; Pelkmans et al. 2001; Ashok & Atwood 2003; Gilbert et al. 2003; Richterová et al. 2001). Transport MPyV z endozomů do ER je závislý na molekulárním motoru dyneinu (Zila et al. 2014). Pro BKV (Moriyama & Sorokin 2008), JCV a SV40 (Ashok & Atwood 2003) důležitost dyneinu nebyla potvrzena. Novější studie pomocí screeningu siRNA ale ukázala důležitost dyneinu pro transport SV40 v HeLa linii (Engel et al. 2011).

Virus, který doputoval do ER, využívá lumenární enzymy na částečné rozvolnění kapsidy. Jedná se o protein disulfid izomerázy (PDI) a oxidoreduktázy (Schelhaas et al. 2007; Magnuson, Emily K. Rainey, et al. 2005; Gilbert et al. 2006; Walczak & Tsai 2011).

Teoreticky je i možná přímá cesta z časných a maturujících endozomů do ER. Byly popsány meziorganelové membránové kontakty mezi endozomy a ER, ale zatím nebyl pozorován žádný přenos nákladu. Je možné, že tyto kontakty také hrají roli v transportu cholesterolu (Rocha et al. 2009; Alpy et al. 2013; Eden et al. 2010).

Transport MPyV do ER je shrnut na obrázku 2.7.





**Obr. 2.7. Schéma transportu MPyV do ER.** MPyV vstupuje do buněk endocytózou v oblasti mikrodoménových raftů, pokračuje hladkými monopinocytickými váčky do časných endozomů (kolokalizuje s Rab5 a EEA1). Dále pokračuje do pozdních endozomů (Rab7). Odtud se dostává do ER (marker BiP). Přerušovanými šipkami jsou naznačeny možné cesty – přímo z časných nebo pozdních endozomů, případně cestou pomocí Rab9 do TGN. Odtud pak na COPI závislou (marker βCOP) nebo nezávislou cestou. MPyV byl nalezen i v recyklujících endozomech (Rab5, Rab11), avšak odtud nepokračuje produktivní cestou).

### 2.3.3 Transport do jádra

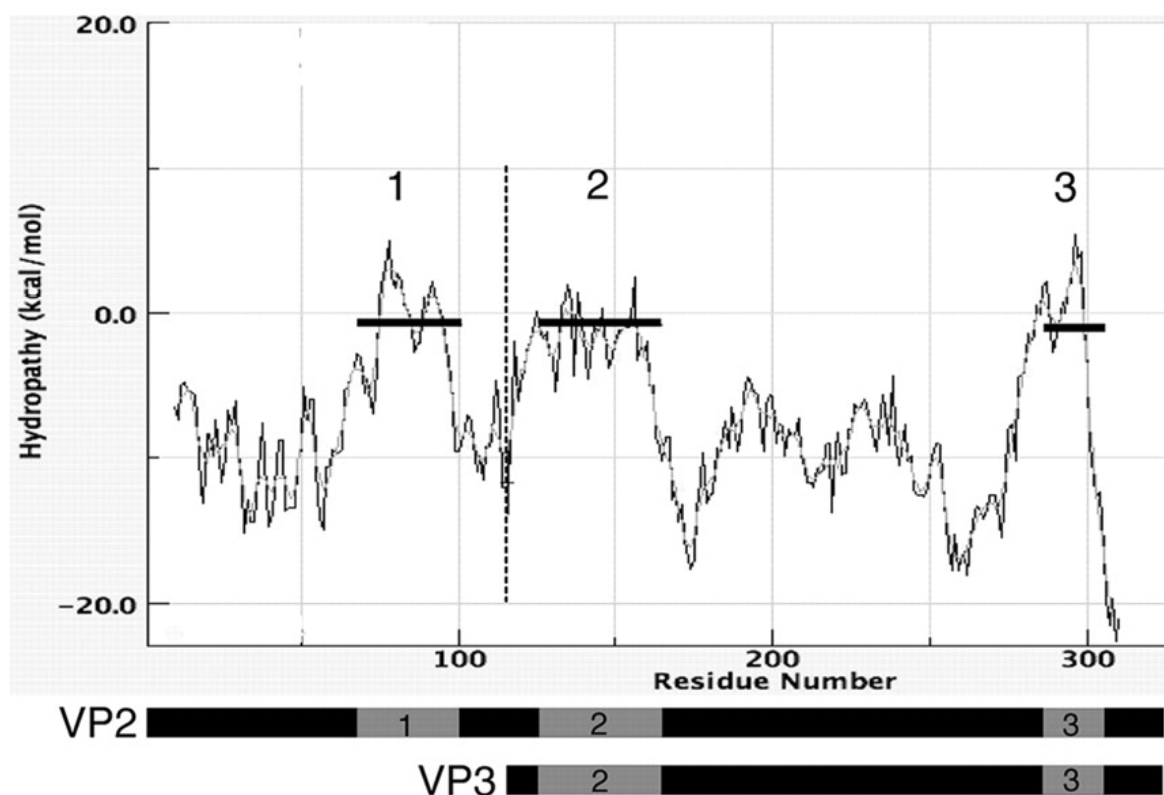
Cílová lokalita při transportu polyomavirů je jádro. Jádro obaluje jaderná membrána (NE). Skládá se ze dvou membrán, vnější je pokračováním ER, vnitřní membrána obklopuje nukleoplazmu. Pro transport dovnitř a ven z jádra slouží komplexy jaderných pórů (NPC). Velikostní limit pro transport jaderným pórem je průměr 39 nm. Viry, které jsou jím transportovány, jsou většinou větší, proto je třeba rozvolnění kapsidy. Import MPyV do jádra stále není dostatečně objasněn.

Transport MPyV do jádra je neefektivní, pouze malá část virionů dojde produktivní cestou až do konce (Mannová & Forstová 2003). Existují 2 možné cesty, kterými je možné genom do jádra doručit. První (a pravděpodobnější) možností je, že u virionu dojde k částečnému rozvolnění kapsidy, poté některý virový protein perforuje membránu ER a virus unikne do cytosolu. Přes NPC je pak virus importován do jádra. Druhá možnost je vstup z ER do jádra přímo narušením vnitřní jaderné membrány.

MPyV v ER využívá některé buněčné faktory pro rozvolnění kapsidy. Jedním z nich je Derlin 2, protein asociovaný s ERAD (ER-associated degradation, ER-asociovaná degradace). Tato dráha je schopná rozpoznat špatně sbalené proteiny uvnitř lumen ER a transportovat je do cytosolu, kde probíhá jejich degradace proteasomem. Je možné, že rozvolněná kapsida je rozeznána jako nesprávně sbalený protein a pomocí ERAD dráhy transportována z ER do cytosolu (Lilley et al. 2006). Dalšími faktory jsou chaperon ERp29 a thiol-oxidoreduktáza (Magnuson, Emily K Rainey, et al. 2005). V rozvolnění viru se uplatňují rovněž protein disulfid izomerázy (PDI) (Gilbert et al. 2006). U SV40 byly též identifikovány faktory v ER, které jsou zodpovědné za rozvolnění kapsidy. Jedná se o PDI, chaperon ERp57 (thiol-disulfid oxidoreduktáza) a proteiny asociované s ERAD, Derlin-1 a Sel1L. PDI rozrušuje interpentamerické disulfidové vazby VP1. Proteiny asociované s ERAD mají u SV40 obdobnou funkci, jako u MPyV (Schelhaas et al. 2007). Dále SV40 využívá několik dalších chaperonů – BiP a čtyř členů z DNAJ rodiny (Goodwin et al. 2011).

Minoritní strukturní proteiny VP2 a VP3 jsou esenciální pro infektivitu MPyV (Mannová et al. 2002). V sekvenci MPyV VP2 byly identifikovány 3 hydrofobní domény (viz obrázek 2.9). První u VP2 v unikátní N-koncové doméně a dvě ve společné části s VP3 (doména 2 na N-koncové části VP3 a doména 3 na C-koncovém  $\alpha$ -helixu). Kvůli strukturním změnám vyvolaných pomocí ERp27 („aktivaci“) se minoritní proteiny vystaví na povrchu kapsidy. Díky doméně 2 jsou oba schopné se inkorporovat do membrány. Ale pouze VP2 obsahující

doménu 1 je schopný membránu perforovat. Doména 3 slouží k interakci s VP1 (Rainey-Barger et al. 2007).



**Obr. 2.8:** Predikované transmembránové domény minoritních proteinů MPyV. Protein VP3 odpovídá dvěma třetinám sekvence VP2, část napravo od přerušované čáry (zbytky 116 až 319). Nalevo je unikátní část proteinu VP2 (zbytky 1 až 115). Zpracováno programem Membrane Protein Explorer 3.0. Převzato z (Rainey-Barger et al. 2007).

Důležitost minoritních proteinů pro infekci SV40 byla též dokázána (Nakanishi et al. 2007; Nakanishi et al. 2006). Obdobně jako u MPyV i v proteinech VP2 a VP3 SV40 byly nalezeny hydrofobní transmembránové domény. Byl navržen model, kdy po rozvolnění kapsidy dojde k uvolnění proteinů VP2 a VP3 a jejich o oligomerizaci v membráně. Tímto dojde k vytvoření kanálu, pomocí kterého je možný únik viru z ER (Daniels et al. 2006).

#### 2.3.4 Replikace, morfogeneze a smrt buňky

Jakmile polyomavírový genom vstoupí do jádra, může začít exprese časných antigenů. LT antigen je importován do jádra a umožní zahájit replikaci virového genomu. Funguje jako helikáza. Váže se do počátku replikace jako dvojice hexamerů (viz kapitola 2.2.2). Začátek replikace virové DNA koreluje s progresí S-fáze infikované buňky, což se děje cca 18 hpi

(Chen & Fluck 2001). Replikace virové DNA se účastní většina proteinů buněčné replikační mašinerie. Probíhá stejně (dvousměrně), jako u buněčné DNA. Replikace je dokončena 180° od replikačního počátku, bez specifické sekvence pro terminaci. Pro oddělení nově zreplikovaných genomů je potřeba topoizomeráza II (Yang et al. 1987). Prostorově je v jádře replikace polyomavirů asociována s PML-NBs (jaderná tělíska asociovaná s promyelotickou leukémií) (Jul-Larsen et al. 2004; Shishido-Hara et al. 2004; Ishov & Maul 1996; Jiang et al. 2011).

Po zahájení replikace virového genomu, dochází k expresi strukturních proteinů. Ty jsou importovány do jádra (viz kapitola 2.2.3). Jakmile je v jádře větší koncentrace nových genomů a strukturních proteinů, začíná probíhat morfogeneze nových virionů. Tento proces stále není detailně objasněn. Byl navržen model tzv. „virových továren“. Jedná se o tubulární struktury, ze kterých „pučí“ nové viriony. Vzhledem k umístění replikace je pravděpodobné, že i morfogeneze bude asociovaná s PML-NBs, ale přímo závislá na nich není. (Erickson et al. 2012) Hlavní kapsidový protein VP1 je schopný samouspořádat se do struktury kapsidy a má též nespecifickou DNA vazebnou aktivitu. Tento model předpokládá, že nejprve dojde k vytvoření tubulů z pentamer VP1. Dovnitř vejde virový chromatin, dojde k uzavření tubulu a „odškrcení“ ikosahedrální kapsidy. U SV40 byla nalezena sekvence na genomu, která slouží jako enkapsidační signál. Tuto sekvenci váže buněčný transkripční faktor Sp1, který interaguje s kapsidovými proteiny (Oppenheim et al. 1992; Dalyot-Herman et al. 1996). U MPyV žádná takováto sekvence nalezena nebyla, s tím že hlavním faktorem pro enkapsidaci je koncentrace virové DNA (Španielová et al. 2014).

Nové viriony opouštějí buňku během nekrotické lyze nebo apoptózy (Huerfano et al. 2010; An et al. 2000). Cytopatický efekt, tedy úplné dokončení virového cyklu, je pozorován cca 48 hpi (Chen & Fluck 2001). U viru SV40 je za lyzi buňky pravděpodobně zodpovědný velmi pozdní protein VP4. Ten je produkován o cca 24 později, než proteiny VP2 a VP3. Funguje jako viroporin, tvoří póry v jaderné i cytoplazmatické membráně (Daniels et al. 2007). U MPyV nebyl VP4 objeven, přičemž jeho funkci pravděpodobně vykonávají proteiny VP2 a VP3 (Rainey-Barger et al. 2007). Dále je možné, že viriony polyomavirů opouštějí buňky i jinak než lyzí. U SV40 byl pozorován výstup závislý na vezikulárním transportu (Clayson et al. 1989). U MPyV byla v pozdní fázi infekce zjištěna asociace s mikrotubuly, které by virus mohl využít pro transport ven z buňky (Sanjuan et al. 2003).

## 2.4 Transport z pozdních endozomů do *trans*-Golgi síťoviny (TGN)

### 2.4.1 Role Rab9

Transport z pozdních endozomů do *trans*-Golgi síťoviny (TGN) je řízen malou GTPázou Rab9 (Lombardi et al. 1993). Typický náklad, který je touto drahou transportován jsou manóza-6-fosfátové receptory (MPR). MPR transportují z GA lysozomální hydrolázy, touto drahou se vracejí zpět do GA. Též je jí transportována endopeptidáza furin (Chia et al. 2011). Spolu s Rab9 spolupracují na transportu proteiny p40 a TIP47. Byly objeveny při studiu transportu MPR (Díaz et al. 1997; Díaz & Pfeffer 1998). TIP47 interaguje s Rab9-GTP, zvyšuje tím afinitu pro náklad (Carroll et al. 2001). Primární lokalizace Rab9 jsou pozdní endozomy. Při expresi GFP-značených verzí GTPáz Rab7 a Rab9 bylo zjištěno, že okupují odlišné membránové domény pozdních endozomů. Z nich se odškrucují váčky směřující k TGN (Barbero et al. 2002).

Každá organela účastnící se vezikulárního transportu má různé povrchové faktory, tzv. SNARE a „tethering“ faktory umožňující specifické cílení a fúze vezikulů. Na organele přijímající váček se nachází tSNARE a na váčku vSNARE. Faktory vSNARE putující do TGN obsahují komplex VAMP3. tSNARE na TGN se skládá z proteinů STX10 (syntaxin 10), STX16 a Vit1a (Ganley et al. 2008). Jako „tethering“ faktor na straně TGN byl objeven člen rodiny Golginů GCC185 (Reddy et al. 2006). GCC185 sdílí interakci jak s Rab9, tak s Rab6, která řídí transport z recyklujících endozomů do TGN. Nejprve by mohlo dojít k interakci Rab9 na váčku s volným GCC185. Poté by se vázal Rab6 na TGN. Touto bipartitní interakcí by mohlo dojít k přiblížení membrán a fúzi váčku s TGN. Na membráně TGN s GCC185 interaguje i GTPáza Arl1. Po fúzi je Rab9 ve formě s GDP vrácen na membrány pozdních endozomů pomocí proteinu GDI (Burguete et al. 2008).

Studie na lidském papillomaviru 16 (HPV16) ukázala důležitost Rab9 při transportu tohoto viru do TGN. (Day et al. 2013). Role této GTPázy při transportu polyomavirů zjišťována nebyla.

### 2.4.2 Role Rab7b

Další GTPázou regulující retrográdní transport z pozdních endozomů do TGN je Rab7b. Jedná se o homolog GTPázy Rab7, spolu s níž se nachází na pozdním endozomu a lysozomu. Dále se však, na rozdíl od Rab7, vyskytuje na TGN a GA. Nejvíce je tato GTPáza produkována v buňkách imunitního systému, především monocytech a od monocytu

odvozených dendritických buňkách. Též byla detekována i v jiných buňkách. Její nejdůležitější funkcí je regulace a kontrola retrográdního transportu z endozomů do TGN. Jako náklady touto drahou transportovány byly identifikovány MPR nezávislé na kationtech, podjednotka B cholera toxinu a sortilin (Yang et al., 2004, Progida et al., 2010; Progida et al., 2012). Zatím není známo, jestli je tato dráha samostatná, nebo jestli Rab7b nespolupracuje s jinými GTPázami.

### **3 Cíle práce**

Transport myšího polyomaviru (MPyV) není ani po letech výzkumu stále zcela objasněn. MPyV do buňky vstupuje hladkými monopinocytickými váčky, pokračuje do časných a pozdních endozomů. Odtud je virus transportován do ER zatím neznámou cestou. Nikdy nebyl pozorován přímo v Golgiho aparátu, avšak nebylo zkoumáno, zda neprochází *trans*-Golgi sítovinou (TGN). Jeho transport je též závislý na nízkém pH endozomálních kompartmentů a mikrotubulech. Pokusy s inhibitem retrográdního transportu, Brefeldinem A (BFA) v minulosti vedly u MPyV k odlišným výsledkům (Mannová & Forstová 2003; Gilbert & Benjamin 2004). BFA inhibuje transport pomocí COPI váček, ale navíc má rozsáhlejší vliv na celý endozomální systém. Zatím jedinou dostatečně popsanou cestou z pozdních endozomů do TGN je dráha zprostředkovaná pomocí Rab9. Tato práce by měla přispět k objasnění toho, jakou cestu využívá MPyV při svém retrográdním transportu z pozdních endozomů.

**Cílem práce je zjistit, zda MPyV při svém transportu do ER prochází TGN a jestli využívá cestu zprostředkovanou GTPázou Rab9.**

**Specifické cíle:**

- Ověřit vliv inhibitorů retrográdního transportu na infekci MPyV, zopakováním pokusu s Brefeldinem A a použitím více specifického inhibitoru, Golgicidu A.
- Pomocí konfokální mikroskopie zjistit, zda MPyV kolokalizuje s markery Golgiho aparátu, TGN a COPI váček.
- Využitím expresních plazmidů zjistit vliv nadprodukce dominantně negativní mutanty Rab9, i divokého typu této GTPázy na infekci MPyV.



## **4 Materiál a metody**

## **4.1 Antibiotika**

Kanamycin (MP Biomedicals, používaná koncentrace 50 µg/ml)

Ampicilin (Biomedika, používaná koncentrace 100 µg/ml)

Směs antibiotik pro tkáňové kultury (Sigma-Aldrich, 100x koncentrovaný roztok obsahuje na 1 ml: 10 000 jednotek penicilinu, 10 mg streptomycinu, 25 mg amphotericinu B)

## **4.2 Kultivační média**

### **4.2.1 Bakteriální média**

Luria-Bertani (LB) médium: 1% (w/v) pepton (Imuna), 0,5% (w/v) kvasničný autolyzát (Imuna), 1% (w/v) NaCl

Živný agar č. 2: 4% Nutrient agar no. 2 (Biolife)

### **4.2.2 Média pro tkáňové kultury**

DMEM médium s 10% FBS:

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma), 10% fetální bovinní sérum (FBS; Sigma), 2 mM L – glutamin (Gibco), podle potřeby 1/100 objemu směsi antibiotik pro tkáňové kultury (Sigma)

DMEM médium bez FBS (BSM): DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma), 2 mM L – glutamin (Gibco)

RPMI médium: RPMI-1640 (Sigma)

## **4.3 Protilátky**

### **4.3.1 Primární protilátky**

(IF – imunofluorescence)

LT1 – Krysí monoklonální protilátka proti LT (pro IF ředěno 50x – 100x; poskytl S. Dilworth, Imperial College School of Medicine, London)

D4 – Myší monoklonální protilátka proti VP1 (pro IF i dot blot ředěno 50x; Forstová 1993)

Králičí monoklonální protilátka proti GM130 (pro IF ředěno 100x, Abcam)

Králičí polyklonální protilátka proti TGN46 (pro IF ředěno 100x, Abcam)

Králičí polyklonální protilátka proti beta COP (pro IF ředěno 200x, Abcam)

Králičí polyklonální protilátka proti GFP kongugovaná s Alexa Fluor 488 (pro IF ředěno 400x-1000x, Invitrogen)

#### **4.3.2 Sekundární proteilátky**

Všechny sekundární protilátky ředěny 1000x

Oslí protilátka proti krysím imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 488 (Invitrogen)

Kozí protilátka proti krysím imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 546 (Invitrogen)

Kozí protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 488 (Invitrogen)

Kozí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s Alexa Fluor 546 (Invitrogen)

Kozí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou (Biorad)

#### **4.4 Enzymy**

Restrikční endonukleáza BamHI (Fermentas)

Neuraminidáza z *Vibrio cholerae*, trypsin (Sigma-Aldrich)

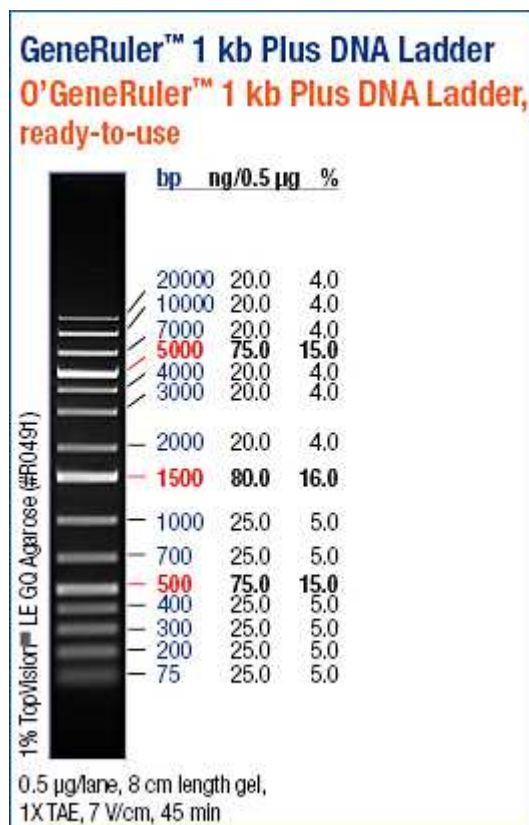
#### **4.5 Inhibitory**

Golgicid A (Sigma-Aldrich)

Brefeldin A (Sigma-Aldrich)

#### **4.6 Markery molekulových hmotností**

O'GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Fermentas) pro agarózovou DNA elektroforézu, viz obr. 4.1.

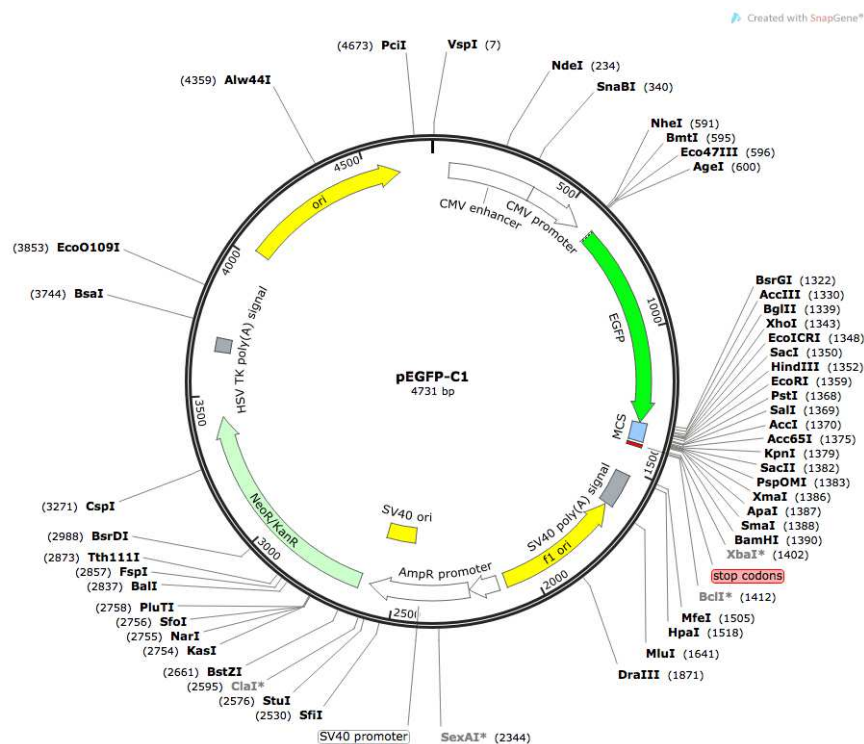


**Obr. 4.1.** O'GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Fermentas) pro agarózovou DNA elektroforézu. Velikost fragmentů je uvedena v párech bazí.

## 4.7 Vektory

### pEGFP-C1:

Plazmidový vektor o velikosti 4731 bp určený k expresi proteinu na N-konci fúzaného s EGFP v savčích buňkách. Sekvence genu pro EGFP je umístěna za cytomegalovirovým (CMV) promotorem, následuje polylinker a polyadenylační signál viru SV40. Dále vektor obsahuje replikační počátek (ori) SV40 pro replikaci v buňkách exprimujících konstitutivně LT antigen viru SV40, časný promotor viru SV40, gen pro rezistenci ke kanamycinu a neomycinu, polyadenylační signál genu pro thymidinkinázu viru *Herpes simplex* umožňující selekci stabilně transfekovaných buněk pomocí G418. Navíc vektor obsahuje bakteriální ori pro propagaci v *E. coli* (pUC), origin replikace f1 pro produkci ssDNA a bakteriální promotor pro expresi genu rezistence ke kanamycinu. Mapa vektoru je na obr. 4.2.



**Obr. 4.2.** Mapa „backbone“ vektoru pEGFP-C1 bez zaklonovaného fragmentu. Převzato od firmy Clontech.

**pEGFP-Rab9 DN:** Do polylinkeru vektoru pEGFP-C1 byla zaklonována sekvence kódující dominantně negativní mutantu GTPázy Rab9 opatřená HA tag sekvencí. Tato mutace spočívá v záměně serinu 21 za asparagin. Tento vektor zajišťuje v savčích buňkách produkci dominantně negativní mutanty proteinu Rab9, opatřené na N-konci sekvencí HA tag a proteinu EGFP.

**pEGFP-Rab9 wt:** Do polylinkeru vektoru pEGFP-C1 byla zaklonována sekvence pro GTPázu Rab9 opatřená sekvencí HA tag. Tento vektor zajišťuje v savčích buňkách produkci proteinu Rab9, opatřeným na N-konci sekvencí HA tag a proteinu EGFP.

Tyto plazmidy (**pEGFP-Rab9 DN** a **pEGFP-Rab9 wt**) byly poskytnuty Ing. P. Grznázovou, VŠCHT. Původně byly připraveny laboratoří Richarda Pagana (Addgene plasmid # 12664 (pEGFP-Rab9 DN), # 12663 (pEGFP-Rab9 wt))(Choudhury et al. 2002).

**pEGFP-N1:** Plazmid pro produkci EGFP v savčích buňkách (Clonotech).

## 4.8 Buněčné linie, bakteriální kmeny a viry

NIH 3T6: stabilní buněčná linie myších fibroblastů odvozená od embryonální tkáně. Senzitivní a permissivní pro myší polyomavirus (prof. Griffin, Royal Postgraduate School, London)

Bakteriální kmen *E. coli* TOP 10: *F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZAM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ-*

Myší polyomavirus, kmen A3 (získán od B. E. Griffin, Royal Postgraduate School, London)

## 4.9 Sterilizace

Roztoky, špičky k pipetám a mikrozkuřavky byly sterilizovány v autoklávu 30 min při 127 °C, 120 kPa. Chemické sklo bylo sterilizováno horkým vzduchem o teplotě 160 °C po dobu 3 hodin. Roztoky, které nemohly být sterilizovány v autoklávu, byly sterilizovány filtrací přes sterilní filtr (šířka pórů 0,22 μm). Bakteriologické hokejky a kličky, pinzety a mikroskopická sklíčka byla sterilizována vyžháním po ponoření do etanolu.

## 4.10 Práce s bakteriemi

### 4.10.1 Kultivace bakterií

Bakterie byly kultivovány buď na pevném agaru v termostatu při 37 °C (staticky), nebo v tekutém médiu (LB) aerobně na třepačce při 37 °C. Pro selekci bakterií obsahující plasmid nesoucí rezistenci vůči antibiotiku, bylo dané antibiotikum do média přidáno v doporučené koncentraci.

### 4.10.2 Příprava chemicky kompetentních buněk pro transformaci tepelným šokem

Z konzervy byly párátkem zaočkovány bakterie *Eschericia coli* kmene TOP10 do 10 ml LB média a byly přes noc aerobně kultivovány na třepačce (200 RPM, 37 °C). Další den byla změřena optická denzita (590 nm, 1 cm kyveta) a z inokula zaočkováno 2x 1ml kultury do 2x 100 ml LB média na OD = 0,1 a kultivováno za stejných podmínek do OD<sub>590</sub> = 0,4 – 0,6. Na ledu byly narostlé kultury rozplněny do 4x 50ml centrifugačních kyvet (Falcon) a následně centrifugovány na centrifuze Sigma 3K30 (3000 RPM, 8 min, 4 °C). Na ledu byl pelet

resuspendován v 15 ml TFB I (celkem 60 ml TFB I). Suspenze byly spojeny do dvou kyvet, inkubovány 5 min na ledu a poté centrifugovány (centrifuga Sigma 3K30; 3000 RPM, 8 min, 4 °C). Pelet byl resuspendován v 3-4 ml TFB II a inkubován 60 min na ledu. Suspenze buněk byla poté na ledu rozplněna do cca 35 plastových mikrozkušavek po 250 µl a uloženy při -80°C.

TFBI: 30 mM KAc, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 100 mM RbCl, 15% (v/v) glycerol (pH 5,8 – upraveno pomocí kyseliny octové)

TFBII: 10 mM MOPS, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM RbCl, 15% (v/v) glycerol (pH 6,5 – upraveno pomocí NaOH)

#### **4.10.3 Transformace tepelným šokem**

V plastových mikrozkušavkách bylo smícháno 10 ng plazmidové DNA se 100µl kompetentních buněk TOP10. Směs byla inkubována 30 min na ledu a poté 1 min v 42 °C vodní lázni. Následně bylo přidáno 800 µl studeného LB média a třepáno 1 hod při 37 °C. 100 µl suspenze bylo vyseto na misku s živným agarem s kanamycinem, zbytek byl centrifugován (centrifuga Sigma 3K30) (3000 RPM, 1 min) a bylo vyseto i zbylé množství. Misky byly inkubovány přes noc při 37 °C.

#### **4.10.4 Skladování bakterií**

Pro krátkodobé skladování byly bakterie na Petriho miskách opatřeny proti vyschnutí a uloženy při 4 °C. Pro dlouhodobé skladování bylo 700 µl bakteriální suspenze smícháno s 300 µl 50% glycerolem (na konečnou koncentraci glycerolu 15%) a uloženo při -80°C.

### **4.11 Práce s tkáňovými kulturami**

Kultivace savčích buněk probíhala v termostatu při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>.

#### **4.11.1 Pasážování savčích buněk linie 3T6**

Buňky na kultivační misce byly kultivovány do plné konfluency. Médium bylo odsáto a buňky opláchnuty Versenovým roztokem (0,25% EDTA v PBS). Byl přidán 0,25% trypsin v PBS (500 µl pro Ø 10 cm misku, 300 µl pro Ø 6 cm misku) a buňky inkubovány 5 min v termostatu při 37°C, do jejich uvolnění z podkladu. Přidáním DMEM se sérem (FBS) byl zastaven účinek trypsinu (10 ml pro Ø 10 cm misku, 6 ml pro Ø 6 cm misku) a buňky byly resuspendovány. Buněčná suspenze byla rozdělena na kultivační misky (v poměru 1:6,

případně 1:3) a doplněna DMEM s FBS (do 10 ml pro misky Ø 10 cm, 6 ml pro Ø 6 cm misku). Při kultivaci na sklíčkách v 24 jamkovém panelu bylo přidáno 60 µl buněčné suspenze a doplněno do 1 ml DMEM s FBS

#### **4.11.2 Transfekce savčích buněk – nukleofekce Amaxa**

Pro transfekci se nechaly narůst buňky do 50-70% konfluence. Médium bylo odsáto a buňky opláchnuty Versenovým roztokem. Buňky byly převedeny do suspenze přidáním trypsinu (viz kapitola 4.11.1). Pomocí Burkerovy komůrky byla spočítána koncentrace buněk na ml. Pro jednu transfekci bylo potřeba  $4 \times 10^6$  buněk. Odpovídající objem homogenní suspenze byl odebrán a centrifugován ( $200 \times g$ , 10 min, laboratorní teplota). Pelet byl resuspendován ve 100 µl „Nucleofection solution“ (Amaxa) a přidáno 2-6 µg plazmidové DNA zbavené endotoxinů. Směs byla resuspendována a přenesena do elektroporační kyvety a v elektroporátoru (Amaxa) byl aplikován puls podle programu T030. K buňkám bylo ihned přidáno 500 µl RPMI média, buňky byly přeneseny do sterilní mikrozkušavky a inkubovány 15 min při 37°C. Buněčná suspenze byla převedena do 24 jamkového panelu s mikroskopickými sklíčky a doplněna kompletním médiem (DMEM s FBS a ATB). Médium bylo po 2-3 h vyměněno za čerstvé.

#### **4.11.3 Transfekce savčích buněk TurboFectem**

TurboFect™ in vitro Transfection Reagent obsahuje kationický polymer ve vodném roztoku. Při vazbě tohoto polymeru na DNA vznikají kladně nabitě komplexy. Je tak zabráněno degradaci DNA a zároveň je umožněna její doprava do buněk.

Na transfekci buněk narostlých na mikroskopických sklíčkách ve 24 jamkové destičce byla připravena transfekční směs. Pro jednu jamku bylo smícháno 100 µl DMEM bez FBS s 1 µg DNA zbavené endotoxinů (viz kapitola 4.14.4) a 2 µl TurboFect™ in vitro Transfection Reagent. Směs byla inkubována 15 – 20 minut při laboratorní teplotě. Směs byla přidána k buňkám do čerstvého DMEM média s FBS. Buňky na sklíčkách byly inkubovány v termostatu při 37 °C. Po 4 – 48 hodinách byla sledována exprese transfekovaných genů.



#### **4.11.4 Fixace a permeabilizace buněk na mikroskopických sklíčkách**

Buňky narostlé na mikroskopických sklíčkách byly opláchnuty PBS. Následovala fixace roztokem paraformaldehydu v PBS (pro 3% 30 min; 3,7% cca 15-20 min) a permeabilizace 0,5% Tritonem X-100 v PBS 5 min. Pokračovalo se promýváním 3x 10 min PBS.

#### **4.11.5 Imunofluorescenční značení proteinů v buňkách**

Vysycení fixovaných a permeabilizovaných buněk se provedlo roztokem 0,25% želatiny s 0,25% BSA v PBS (30 – 90 min, nebo přes noc). Poté byl přidán naředěný roztok primární protilátky v roztoku 0,25% želatiny s 0,25% BSA v PBS, inkubováno 1 h. Následovalo promývání 3x10 min PBS. Byl přidán roztok sekundární protilátky naředěný v roztoku 0,25% želatiny s 0,25% BSA v PBS, inkubováno 30 min ve tmě. Poté znovu následoval promyv PBS 3x10 min. Sklíčka byla opláchnuta v dH<sub>2</sub>O. Ochlá sklíčka byla položena na podložní sklo s kapkou 50% glycerolu s DAPI (0,1 µg/ml). Preparáty byly pozorovány na fluorescenčním mikroskopu BX-60 (Olympus) nebo na konfokálním mikroskopu Carl Zeiss LSM 880 NLO (Zeiss).

#### **4.11.6 Měření cytotoxicity**

Pomocí komerční soupravy „CytoTox 96® NonRadioactive Cytotoxicity Assay“ (Promega) lze změřit procento mrtvých buněk pomocí aktivity enzymu laktát dehydrogenázy uvolněné v médiu přidáním chromogenního substrátu. Buňky 3T6 narostlé na 24-jamkovém panelu v duplikátech pro odběr média a lyzování buněk. Z poloviny (vzorky „medium“) bylo odebráno 500 µl média, centrifugováno (300×g, 5 min, 4 °C), odebrána část supernatantu a uskladněna při 4°C. K druhé polovině (vzorky „lysis“) bylo přidáno 1/10 objemu 9 % Tritonu X-100, resuspendováno a inkubováno 30 min při 37 °C. Byly odebrány vzorky a uskladněny při 4°C. Na mikrotitrační destičku byly nanесeny vzorky (50 µl/ jamka) a přidáno reagent (50 µl/ jamka). Inkubováno 30 min ve tmě při laboratorní teplotě, poté bylo přidán „stop solution“ (50 µl/ jamka). Byla změřena absorbance při 490 nm. Procento cytotoxicity bylo vypočítáno jako poměr absorbancí vzorků „medium“ a „lysis“ po odečtení „absorbance blank“ vzorku.

#### **4.11.7 Infekce savčích buněk virem**

Virová suspenze byla ve stolním sonikátoru sonikována 1 min. Buňky byly nechány narůst do 50-70% konfluence. Bylo od nich odsáto médium (DMEM s FBS) a opláchnuty DMEM bez FBS. Poté bylo přidáno 1 ml DMEM bez FBS na Ø 10 cm misku, nebo 200 µl na mikroskopické sklíčko v 24 jamkové destičce. Pro dosažení požadované multiplicity infekce bylo přidáno odpovídající množství virového inokula. Při případnou synchronizaci infekce byly buňky po přidání viru inkubovány 40 min na ledu. Buňky byly inkubovány v termostatu při 37 °C cca 1 hod za občasného kývání, poté bylo přidáno médium (DMEM s FBS). Doba infekce byla měřena od okamžiku vložení do termostatu.

#### **4.12 Izolace myšího polyomaviru**

Buňky linie 3T6 byly pasážovány na 10 Petriho misek o Ø10 cm. Další den bylo médium (DMEM s FBS) odsáto, následovalo opláchnutí bezsérovým médiem (BSM). Poté bylo na každou misku přidáno 1 ml BSM. Buňky byly infikovány myším polyomavirem s multiplicitou 0,1 ffu (fluorescence forming units) na buňku. Buňky na miskách byly inkubovány 1 hodinu v termostatu při 37 °C za občasného kývání. Po této době bylo k buňkám přidáno médium s FBS. Pátý den bylo vyměněno médium za čerstvé. Šestý den byly misky s buňkami zamrazeny při -80 °C. Následně byly misky 2x rozmrazeny a opětovně zmrazeny.

Po třetím rozmražení byly buňky na miskách seškrabány pryžovým škrabátkem, i s médiem a zcentrifugovány na centrifuze Sigma 3K30 (4800 RPM, 30 min, 4 °C). Supernatant byl slit a uchován při 4 °C, buněčný pelet resuspendován v 1 ml pufru B. Resuspendované pelety byly spojeny a následně na ledu homogenizovány v Potterově homogenizátoru v 5 cyklech po 10 pohybech skleněným pístem. K homogenizátu bylo přidáno 5 µl inhibitoru proteázy aprotinin (koncentrace 1 µl/ml) a 4 µl neuraminidázy (koncentrace 0,8 µl/ml) a homogenizát byl inkubován přes noc při laboratorní teplotě za stálého kývání.

Další den byla suspenze zcentrifugována na centrifuze Sigma 3K30 (4800 RPM, 30 min, 4 °C), supernatant byl oddělen a spojen s předchozím a uchován při 4 °C. Pelet byl resuspendován v 1 ml 10 mM tris-HCl (pH = 9) a inkubován přes noc při pokojové teplotě za stálého kývání. Směs byla poté znovu centrifugována (centrifuga Sigma 3K30) (4800 RPM, 30 min, 4 °C), přičemž supernatant byl spojen s předchozími a sediment vyhozen.

B pufr: 10 mM tris-HCl (pH = 7,4), 150 mM NaCl, 10  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>

#### **4.12.1 Centrifugace přes sachárový polštář**

Supernatanty získané z infikovaných buněk a médií obsahující virové částice byly přečištěny a zároveň zahuštěny přes 10% sacharózy polštář. 10% roztok sacharózy v pufru B byl přefiltrován přes membránový filtr 0,22  $\mu$ m s prefiltrem 0,8  $\mu$ m. Následně jím byl podvrstven (cca 3 ml) supernatant v ultracentrifugačních kyvetách (Beckman Polyallomer Centrifuge Tubes 25×89 mm) a byl centrifugován na ultracentrifuze Beckman Optima L-90K (rotor SW28, 25000 RPM, 3 h, 4 °C). Sediment byl resuspendován v 1 ml pufru B a následně zamražen při -20 °C.

#### **4.12.2 Izopyknická centrifugace v rovnovážném gradientu CsCl**

Při centrifugaci roztoku CsCl se ustaví hustotní gradient, kterého lze využít pro rozdělení virionů, případně prázdných kapsid, na základě vznášivé hustoty. Vzorky po centrifugaci přes sachárový polštář byly homogenizovány ve skleněném minihomogenizátoru. Suspenze se dále spojila s CsCl v hmotnostním poměru 2,5:1,2, aby výsledná hustota vzorku byla 1,3 g/cm<sup>3</sup>. Pro centrifugační kyvety do rotoru SW 41 (Beckman Polyallomer Ultra-Clear Centrifuge Tubes 14×89 mm) je optimální 7,9 g virové suspenze + 3,79 g CsCl. Po úplném rozpuštění CsCl byl změřen index lomu, který by měl odpovídat rozmezí 1,363 – 1,366. Dále byl roztok v kyvetách převrstven parafinovým olejem a vyvážen na 3 desetinná místa. Centrifugace probíhala na centrifuze Beckman Optima L-90K (rotor SW41, 35000 RPM, 20-24 h, 18 °C). Výsledný gradient byl rozdělen na frakce po 300-400  $\mu$ l pomocí peristaltické pumpy. U jednotlivých frakcí byl změřen index lomu. Následně byly frakce s viriony pospojovány a CsCl byl z roztoku odstraněn dialýzou.

#### **4.12.3 Dialýza**

Dialyzační střevo je ze semipermeabilní membrány, která umožňuje průchod nízkomolekulárních látek (např. CsCl) z prostředí o větší koncentraci do prostředí s menší koncentrací. Vysokomolekulární látky (proteiny, DNA), tedy i viriony neprocházejí a jsou zadrženy uvnitř střeva. Dialyzační střevo bylo povařeno v destilované vodě 10 min. Do střeva opatřeného svorkami byly nanášeny jednotlivé vzorky a poté inkubovány v cca 1,4 l pufru B při 4 °C za stálého míchání 1 h. Poté byl pufr vyměněn (cca 1,6 l) a inkubace probíhala přes

noc. Dále byly vzorky zahuštěny centrifugací přes sacharózový polštář (rotor SW41, 35000 RPM, 3 h, 4 °C). Sediment byl resuspendován v 200 µl pufru B a vzorky uchovány při -20 °C.

#### 4.12.4 Hemaglutinace

Celkové množství virových částic (plných i prázdných) lze přibližně stanovit pomocí hemaglutinačního testu (v jednotkách HAU = hemagglutination units). Tato metoda je založena na schopnosti kapsidového proteinu VP1 vázat kyselinu sialovou na buněčných membránách. Takto jsou virové částice schopny aglutinovat erytrocyty, přičemž míra aglutinace závisí na množství částic. V mikrotitrační destičce s kulatým dnem aglutinované erytrocyty nesedimentují, neaglutinované tvoří terčík na dně jamky. Ředění viru, při kterém ještě erytrocyty aglutinovaly, odpovídá počtu hemaglutinačních jednotek.

Morčecí krev byla zcentrifugována na centrifuze Sigma 3K30 (2500 RPM, 20 min, 4 °C) a třikrát promyta roztokem 0,2% BSA v PBS. Koncentrace erytrocytů je ověřována hematokritem. Do 75 mm heparizované kapiláry bylo naneseno 30 µl suspenze erytrocytů a na konci zatavena pomocí lihového kahanu. Následně byla kapilára centrifugována na centrifuze MPW 300 (Mechanika Precyzyjna Warszawa) s rotorem CM-304 (2500 RPM, 5 min, laboratorní teplota). Hematokrit byl odečten jako procentuální vyjádření výšky sloupce PBS k výšce sloupce erytrocytů. Suspenze erytrocytů byla naředěna roztokem 0,2% BSA v PBS na koncentraci 0,4% erytrocytů.

Do všech jamek na mikrotitrační destičce bylo přidáno 50 µl 0,2% BSA v PBS. Do první jamky bylo přidáno 50 µl 10x naředěné virové suspenze. Následně bylo z první jamky po dobrém promíchání odebráno 50 µl a přeneseno do následující jamky. Pokračováním tohoto postupu až k poslední jamce byla vytvořena ředící řada viru. Poté bylo do každé jamky přidáno 50 µl 0,4% suspenze morčecích erytrocytů. Destička byla uložena v lednici a výsledky byly odečteny nejdříve po 10 hodinách. Množství virových částic v HAU bylo spočítáno podle rovnice:

$$\text{HAU} = d \times 2^{n+1}$$

d = ředění viru (10x)

n = počet jamek s pozitivní hemaglutinací

1 HAU pro myší polyomavirus odpovídá  $1 \times 10^7$  virových částic/ml.

#### **4.12.5 Určení infekčního titru viru v kultuře myších fibroblastů**

Buňky linie 3T6 narostlé na sklíčkách byly infikovány virovým inokulem o neznámém titru naředěným 100x, 1000x, 10 000x a 100 000x v DMEM bez FBS (viz kapitola 4.11.7). 24 hodin po infekci byly buňky fixovány a imunofluorescenčně značeny pomocí protilátky proti LT antigenu. Infikované buňky byly následně spočítány při zvětšení objektivu 40x, pro který je plocha zorného pole  $0,237 \text{ mm}^2$ . Výsledný titr virového inokula (v ffu/ml – fluorescence forming units/ml) byl vypočítán jako součin průměrného počtu infikovaných buněk na pole, ředění virového inokula, faktoru přepočtu (pro plochu zorného pole při zvětšení objektivu 40x je jeho hodnota 844) a násobku objemu virového inokula v konečném objemu média (=5).

#### **4.13 Elektronová mikroskopie**

Preparáty byly pozorovány pod transmisním elektronovým mikroskopem JEOL 1011. Část experimentů elektronové mikroskopie provedl Martin Fraibek.

##### **4.13.1 Negativní barvení**

Po přípravu elektronmikroskopických preparátů byly využity měděné sítky (typ: 200 mesh) s parlodionovým podložním filmem s napařenou vrstvou uhlíku. V pokovovací aparatuře byla provedena aktivace filmu vysokonapětovým výbojem. Na kapku (5  $\mu\text{l}$ ) vzorku byla položena síťka, adsorpce probíhala 5-10 min. Poté následovalo promývání 2x 10 min na kapkách (100  $\mu\text{l}$ )  $\text{dH}_2\text{O}$  a barvení 2x 1 min na kapkách (100  $\mu\text{l}$ ) 2% vodného roztoku PTA  $\{\text{H}_3[\text{P}(\text{W}_3\text{O}_{10})_4]\}$ ,  $\text{pH} = 7$ . Sítky byly osušeny filtračním papírem a nechány zaschnout. Preparáty byly pozorovány na elektronovém mikroskopu JEOL JEM 1200EX při 60 kV.

#### **4.14 Práce s DNA**

##### **4.14.1 Minipreparace plazmidové DNA**

Izolace plazmidů komerční soupravou „GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit“ (Sigma-Aldrich).

Bakteriální kolonie vyrostlé po transformaci na Petriho miskách s živným agarem se selekčním antibiotikem byly sterilním párátkem odebrány, nanесeny na novou Petriho misku s živným agarem se selekčním antibiotikem a párátko bylo vhozeno do baňky s 4 ml LB média. Tato kultura byla přes noc inkubována při  $37^\circ\text{C}$  za stálého třepání (200 RPM). 2ml narostlé kultury byly zcentrifugovány ( $12000 \times g$ , 1 min), supernatant byl slit a buněčný pelet

resuspendován v 200  $\mu$ l „Resuspension Solution“, obsahujícím RNázu A. Dále bylo přidáno 200  $\mu$ l Lysis Buffer, směs byla promíchána obrácením zkumavky 4-6x a inkubována 3-5 min za laboratorní teploty. Bylo přidáno 350  $\mu$ l „Neutralization/Binding Buffer“, zkumavka obrácena 4-6x a zcentrifugována ( $12000 \times g$ , 10 min). Do plastové mikrozukavky byl vložen „Miniprep Binding Column“ (kolonka). Do kolonky bylo přidáno 500  $\mu$ l „Column Preparation Solution“. Kolonka byla dále zcentrifugována ( $12000 \times g$ , 30-60 s), supernatant byl slit. Buněčný lyzát byl přenesen do kolonky a zcentrifugován ( $12000 \times g$ , 30-60 s), tekutina vyhozena. Do kolonky bylo přidáno 500  $\mu$ l „Wash Solution 1“, zcentrifugováno ( $12000 \times g$ , 30-60 s), tekutina vylita. Bylo přidáno 750  $\mu$ l „Wash Solution 2“, centrifugováno ( $12000 \times g$ , 30-60 s), tekutina vylita. Celá kolonka byla centrifugována ( $12000 \times g$ , 1 min). Kolonka byla přenesena na novou mikrozukavku a pro uvolnění DNA bylo přidáno 100  $\mu$ l „Elution Solution“ a zcentrifugováno ( $12000 \times g$ , 1 min). Izolovaná plazmidová DNA byla uložena při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.14.2 Štěpení DNA restrikčními endonuklázami**

Složení restrikční směsi pro ověření izolovaných plazmidů bylo následovné:

dH<sub>2</sub>O do celkového objemu reakce 20  $\mu$ l

0,5  $\mu$ g DNA

2  $\mu$ l 10x koncentrovaného pufru pro restrikční endonukleázy

5 U restrikčního enzymu

Restrikční enzym byl přidán do směsi jako poslední. Štěpení probíhalo 2,5 h při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Kvalita štěpení byla ověřena elektroforeticky.

#### **4.14.3 Agarózová elektroforéza**

1% agarózový gel byl připraven rozvařením 0,2 g agarózy (Amresco) ve 20 ml 0,5x TBE. Po ochlazení na přibližně  $50^{\circ}\text{C}$  byl roztok agarózy nalit do plastového bločku, bylo v něm rozmícháno 10  $\mu$ l etidumbromidu (zásobní koncentrace 2000x, do výsledné koncentrace 0,5  $\mu$ g/ml) a vložen hřeben. Po ztuhnutí byl hřeben vytažen a do jamek byl nanesen marker molekulových vah (3  $\mu$ l) a vzorky (8  $\mu$ l roztoku DNA smíchané s 5x koncentrovanou bromfenolovou modří). Aparatura byla připojena ke zdroji stejnosměrného napětí tak, aby elektroforéza probíhala při napětí 5 V/cm. Po skončení byl gel prohlédnut a vyfocen pod UV transiluminátorem.

TBE: 45 mM kyselina boritá, 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA-NaOH, pH = 8

#### **4.14.4 Maxipreparace plazmidové DNA zbavené endotoxinů pro transfekci savčích buněk**

Maxipreparace plazmidové DNA zbavené endotoxinů byla provedena pomocí komerční soupravy „JETSTAR NoEndo Maxikit“ (Genomed). Přes noc byla kultivována bakteriální kultura ve 100 ml LB média se selekčním antibiotikem. Do kolony bylo přidáno 30 ml ekvilibračního pufru (E4), proteklá tekutina byla vyhozena. Bakteriální kultura byla zcentrifugována ( $1200 \times g$ , 3 min) a buněčný pelet resuspendován v 10 ml resuspendačního pufru (E1) s RNázou A. Suspenze byla přenesena do 50ml centrifugační zkumavky a bylo přidáno 10 ml lyzačního pufru (E2), opatrně promícháno a inkubováno za pokojové teploty 5 min. Dále bylo přidáno 10 ml precipitačního pufru (E3), promícháno obrácením zkumavky a zcentrifugováno ( $12000 \times g$ , 10 min). Supernatant byl přenesen do další sterilní zkumavky a centrifugován ( $12000 \times g$ , 5 min). Supernatant byl smíchán s „Endo-1“ pufrem odpovídající 1/10 objemu supernatantu a promícháno. Dále byl přenesen na připravenou kolonku, proteklá tekutina vyhozena. Kolonka byla promyta 30 ml „Endo-2“ pufrem (E5). Pod kolonku byla umístěna 30ml eluční zkumavka (bez endotoxinů a pyrogenů). Do kolony přidáno 15 ml elučního pufru (E6) pro eluci DNA. Do eluční zkumavky bylo přidáno 10,5 ml isopropanolu a centrifugováno ( $12,000 \times g$ , 30 min,  $4^\circ\text{C}$ ), supernatant vyhozen. Pelet DNA byl resuspendován v 5 ml 70% etanolu, centrifugován ( $12,000 \times g$ , 5–10 min,  $4^\circ\text{C}$ ) a supernatant vyhozen. DNA pelet byl vysušen na vzduchu 10-15 min za pokojové teploty a poté rozpuštěn v 200  $\mu\text{l}$  TE pufru (bez endotoxinů).

### **4.15 Imobilizace proteinů na membráně**

#### **4.15.1 Dot Blot**

Na nitrocelulózovou membránu NC 45 (Serva) bylo nakapáno 1 - 5  $\mu\text{l}$  vzorků obsahující protein, necháno zaschnout.

#### **4.15.2 Imunologická detekce proteinů imobilizovaných na membráně**

Nitrocelulózová membrána s proteiny byla inkubována v PBS s 5% odtučněným mlékem 30 min při laboratorní teplotě, nebo přes noc při  $4^\circ\text{C}$ . Následovalo opláchnutí PBS a 1,5 hod inkubace s primární protilátkou naředěnou v PBS s 5% odtučněným mlékem. Poté byla membrána 3x 10 min promývána v PBS a 30 min inkubována se sekundární protilátkou,

konjugovanou s křenovou peroxidázou, naředěnou v PBS s 5% odtučněným mlékem. Opět promýváno 3x 10 min v PBS. V temné komoře byla membrána inkubována v roztoku luminolu (smíchaný roztok A a B) 20 sekund, vložena do průhledné fólie a přiložen RTG film. Expozice trvala 30-60 s. Film byl vyvolán ve vývojce a ustalovači.

Roztok A:

18 ml dH<sub>2</sub>O

2 ml 1M Tris-HCL pH 8,5

200 µl 0,5% (w/v) luminolu v DMSO

88 µl 1,5% (w/v) kyseliny p-kumarové v DMSO

Roztok B:

18 ml dH<sub>2</sub>O

2 ml 1M Tris-HCl pH 8,5

20 µl 30% (w/w) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma)



## **5 Výsledky**

## 5.1 Izolace myšího polyomaviru

Pro studium transportu myšího polyomaviru byl tento virus izolován dvakrát. Kultura myších fibroblastů 3T6 byla infikována myším polyomavirem (kmen A3), podle kapitoly 4.11.7. Viriony byly purifikovány centrifugací přes sacharózový polštář a izopyknickou centrifugací v rovnovážném gradientu CsCl. Poté byl gradient rozdělen na frakce, které byly spojeny podle refraktometrických indexů. Zakoncentrování proběhlo další centrifugací přes sacharózový polštář.

### 5.1.1 První izolace

V tabulce 5.1. jsou uvedeny refraktometrické indexy ( $\eta$ ) jednotlivých frakcí rozděleného CsCl gradientu. Podle těchto hodnot byly frakce spojeny do tří frakcí – frakce I ( $\eta = 1,371 - 1,167$ ), frakce II obsahující plné částice ( $\eta = 1,360 - 1,3625$ ) a frakce III s prázdnými částicemi ( $\eta = 1,362 - 1,359$ ).

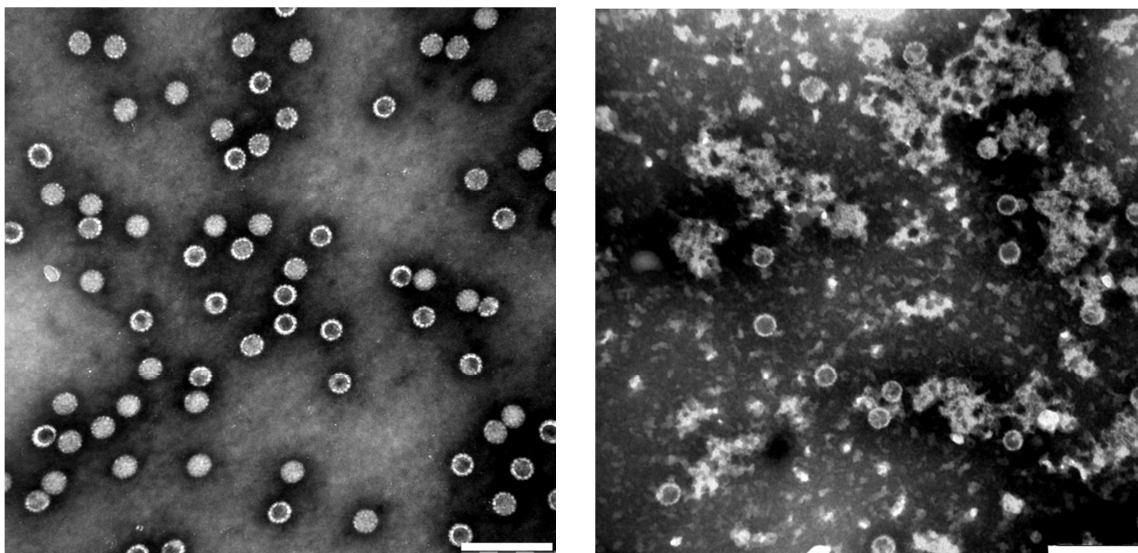
č.	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7	1.8
$\eta$	1,3700	1,3770	1,3755	1,3730	1,3710	1,3700	1,3690	1,3680
					Frakce I			
č.	1.9	1.10	1.11	1.12	1.13	1.14	1.15	1.16
$\eta$	1,3660	1,3660	1,3650	1,3650	1,3650	1,3640	1,3640	1,3630
	Frakce II							
č.	1.17	1.18	1.19	1.20				
$\eta$	1,3625	1,3620	1,3610	1,3590				
	Frakce II	Frakce III						

č.	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	2.7	2.8
η	1,3580	1,3640	1,3750	1,3770	1,3760	1,3740	1,3720	1,3700
								Frakce I
č.	2.9	2.10	2.11	2.12	2.13	2.14	2.15	2.16
η	1,3690	1,3680	1,3670	1,3660	1,3660	1,3650	1,3650	1,3640
	Frakce I			Frakce II				
č.	2.17	2.18	2.19	2.20	2.21	2.22		
η	1,3630	1,3630	1,3625	1,3610	1,3600	1,3590		
	Frakce II			Frakce III				

č.	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5	3.6	3.7	3.8
η	1,3710	1,3770	1,3750	1,3730	1,3710	1,3690	1,3680	1,3670
					Frakce I			
č.	3.9	3.10	3.11	3.12	3.13	3.14	3.15	3.16
η	1,3660	1,3660	1,3650	1,3650	1,3640	1,3640	1,3630	1,3630
	Frakce II							
č.	3.17	3.18	3.19	3.20	3.21			
η	1,3625	1,3620	1,3610	1,3600	1,3600			
	Frakce II	Frakce III						

**Tab. 5.1. Refraktometrické indexy (η) jednotlivých frakcí po rozdělení CsCl gradientu v první izolaci.**

Frakce po spojení byly dialyzovány v B pufru a zahuštěny centrifugací přes sacharózový polštář. Dále byl určen infekční titr na kultuře myších fibroblastů (v ffu/ml; fluorescence forming units/ml – viz kapitola 4.12.5) a také hemaglutinační titr (viz kapitola 4.12.4) Jejich hodnoty jsou uvedeny v tabulce 5.2. U frakce II a III byla provedena elektronová mikroskopie pro ověření kvality izolace (viz obrázek 5.1). Ve frakci II se vyskytovaly plné viriony, méně prázdných částic a minimum nečistot. Třetí frakce, kromě prázdných kapsid, obsahovala velké množství nečistot.



**Obr. 5.1. Elektronmikroskopické snímky myšího polyomaviru z první izolace.** Frakce II obsahující plné virové částice (vlevo) a frakce III s prázdnými kapsidami (vpravo). Negativní barvení. Úsečka = 200 nm, Fotografii II. frakce zhotovil Martin Fraiberk.

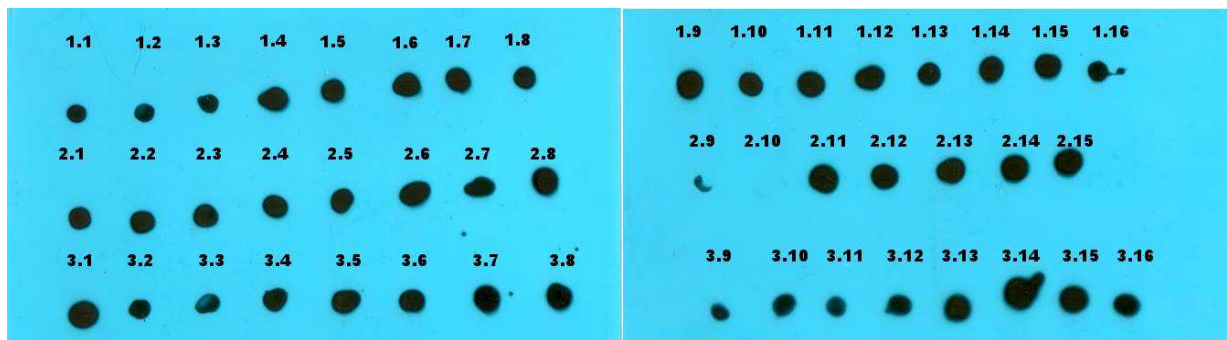
	<b>Frakce I</b>	<b>Frakce II</b>	<b>Frakce III</b>
<b>Ffu/ml</b>	$6,6 \times 10^5$	$2,8 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$
<b>Virionů/ml</b>	$1 \times 10^{11}$	$4 \times 10^{11}$	$4 \times 10^{11}$

**Tab. 5.2. Infekční (ffu/ml) a hemaglutinační titr (viriony/ml) frakcí z první izolace.**

Hemaglutinační titr udává počet celkových částic. Pro frakci II na jednu infekční částici (při infekci 3T6 fibroblastů) připadá cca  $1,4 \times 10^4$  neinfekčních částic. Ve frakci III je neinfekčních částic více, asi  $3,1 \times 10^4$  na jednu infekční.

### 5.1.2 Druhá izolace

Podle refraktometrických indexů změřených pro jednotlivé frakce rozděleného CsCl gradientu (tabulka 5.2) byly nakapané frakce pospojovány do tří frakcí. Frakce I ( $\eta = 1,371 - 1,367$ ), frakce II obsahující plné částice ( $\eta = 1,360 - 1,3625$ ) a frakce III s prázdnými částicemi ( $\eta = 1,362 - 1,359$ ). Pro kontrolu byla provedena detekce proteinu VP1 v jednotlivých frakcích pomocí metody dotblot (obrázek 5.2). VP1 protein byl detekován ve všech frakcích. Dva zřejmé píky VP1 koncentrace odpovídají plným a prázdným virovým částicím.



**Obr. 5.2. Detekce proteinu VP1 ve frakcích 3 CsCl gradientů při izolaci MPyV. Dotblot.** Byla použita primární protilátka proti proteinu VP1 a sekundární protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou.

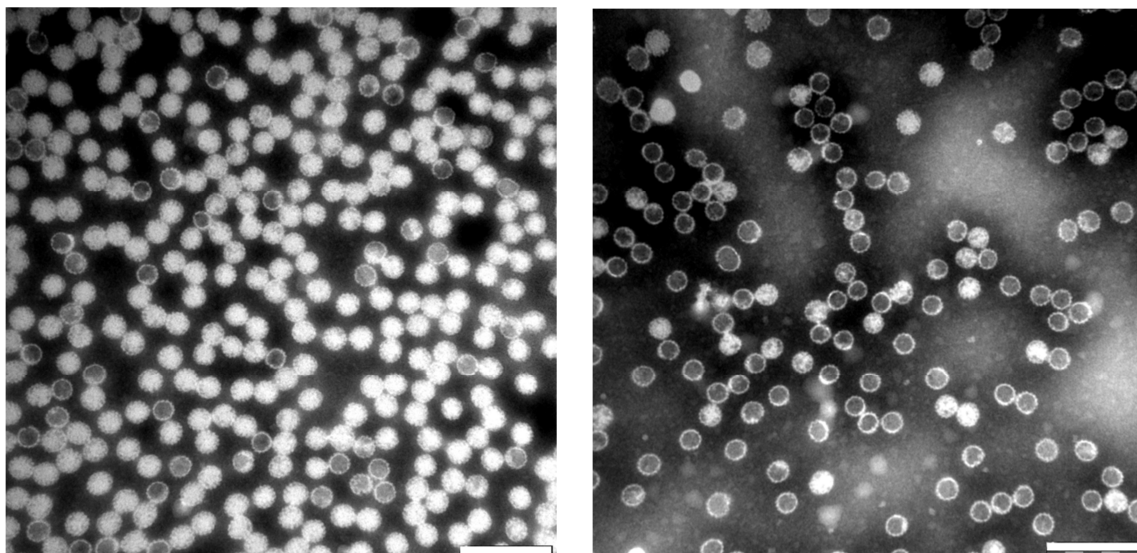
č.	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7	1.8
	1,368	1,371	1,369	1,367	1,366	1,365	1,365	1,364
$\eta$	--	Frakce I			Frakce II			
č.	1.9	1.10	1.11	1.12	1.13	1.14	1.15	1.16
	1,363	1,363	1,362	1,361	1,36	1,359	1,358	1,357
$\eta$	Frakce II		Frakce III					--

č.	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	2.7	2.8
	1,368	1,371	1,369	1,367	1,366	1,365	1,365	1,364
η		Frakce I			Frakce II			
č.	2.9	2.10	2.11	2.12	2.13	2.14	2.15	
	1,363	1,363	1,362	1,362	1,36	1,359	1,358	
η	Frakce II		Frakce III					

č.	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5	3.6	3.7	3.8
	1,358	1,376	1,375	1,373	1,372	1,37	1,367	1,367
η						Frakce I		
č.	3.9	3.10	3.11	3.12	3.13	3.14	3.15	3.16
	1,366	1,365	1,365	1,364	1,364	1,363	1,3625	1,361
η	Frakce II							Frakce III
č.	3.17							
	1,359							
η	Frakce III							

**Tab. 5.2. Refraktometrické indexy (η) jednotlivých frakcí z druhé izolace viru.**

Po dialýze spojených frakcí v B pufru a zahuštění centrifugací přes sacharóový polštář byl určen infekční titr (v ffu/ml; fluorescence forming units/ml) a hemaglutinační titr, viz tabulka 5.3. Snímky elektronové mikroskopie pro kontrolu kvality izolace jsou na obrázku 5.2. Frakce II obsahovala velké množství plných virionů a malé množství prázdných kapsid. Frakce III se skládala z prázdných kapsid, malého množství plných virionů a menšího množství nečistot.



**Obr. 5.3. Snímky z elektronové mikroskopie myšího polyomaviru druhé izolace. Frakce II obsahuje plné viriony (vlevo) a frakce III prázdné kapsidy (vpravo). Úsečka = 200 nm.**

	<b>Frakce I</b>	<b>Frakce II</b>	<b>Frakce III</b>
<b>Ffu/ml</b>	$1,18 \times 10^5$	$9,45 \times 10^7$	$1,38 \times 10^7$
<b>Virionů/ml</b>	$5,7 \times 10^8$	$5,8 \times 10^{11}$	$4,1 \times 10^{11}$

**Tab. 5.3. Infekční (ffu/ml) a hemaglutinační titr (viriony/ml) frakcí z druhé izolace.**

Frakce II, obsahující hlavně plné částice, měla na jednu infekční částici asi  $6,1 \times 10^3$  neinfekčních virových částic. Frakce III měla tento poměr téměř o řád vyšší, a to asi  $3 \times 10^4$  neinfekčních částic na jednu infekční. Druhá izolace dopadla o poznání lépe, než první. Frakce II obsahovala v poměru mnohem méně neinfekčních částic, než při první izolaci. Navíc obě frakce obsahovaly méně nečistot. Několikrát pasážírováním viru dochází ke kumulaci mutací a poklesu infekčního titru. Virus použitý pro pomnožení při druhé izolaci pocházel z virového izolátu získaného po tranfekci buněk virovým genomem vyštěpeným z plasmidu.

## 5.2 Vliv inhibitorů retrográdního transportu na infekci myším polyomavirem

Při studiu retrográdního transportu a jeho využití různým nákladem (proteiny, receptory, toxiny, viry atd.) je často používáno inhibitorů těchto drah. Přerušení tohoto transportu je docíleno inhibicí některých enzymů, případně jejich regulačních proteinů. V této diplomové práci byl zjišťován vliv dvou inhibitorů na infekci našeho modelového viru, MPyV.

Golgicid A (GCA) je účinný, reverzibilní, specifický inhibitor *cis*-GA ArfGEF (výměnného faktoru guanin nukleotidu GTPázy Arf), GBF1. Funkce GTPázy Arf je nezbytná pro tvorbu COPI váčků sloužící pro transport z GA do ER. GCA má za následek rozrušení struktury GA i TGN (Sáenz et al. 2009).

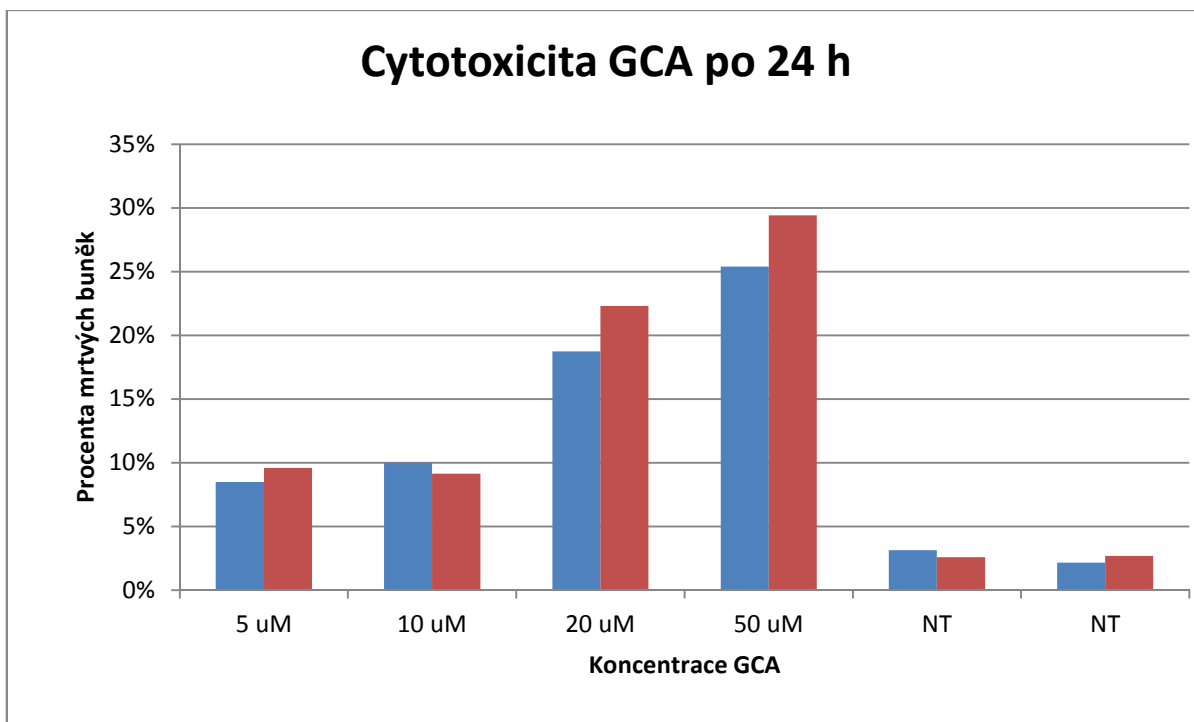
Brefeldin A (BFA) inhibuje ArfGEF GBF1. Obdobně dochází k inhibici Arf a transportu pomocí COPI váčků. Oproti GCA je ale méně specifický a má za následek vytvoření tubulárních útvarů z endozomálního systému (Donaldson et al. 1992; García-Mata et al. 2003), (Lippincott-Schwartz et al. 1991; Tooze 1992).

### 5.2.1 Cytotoxicita inhibitorů

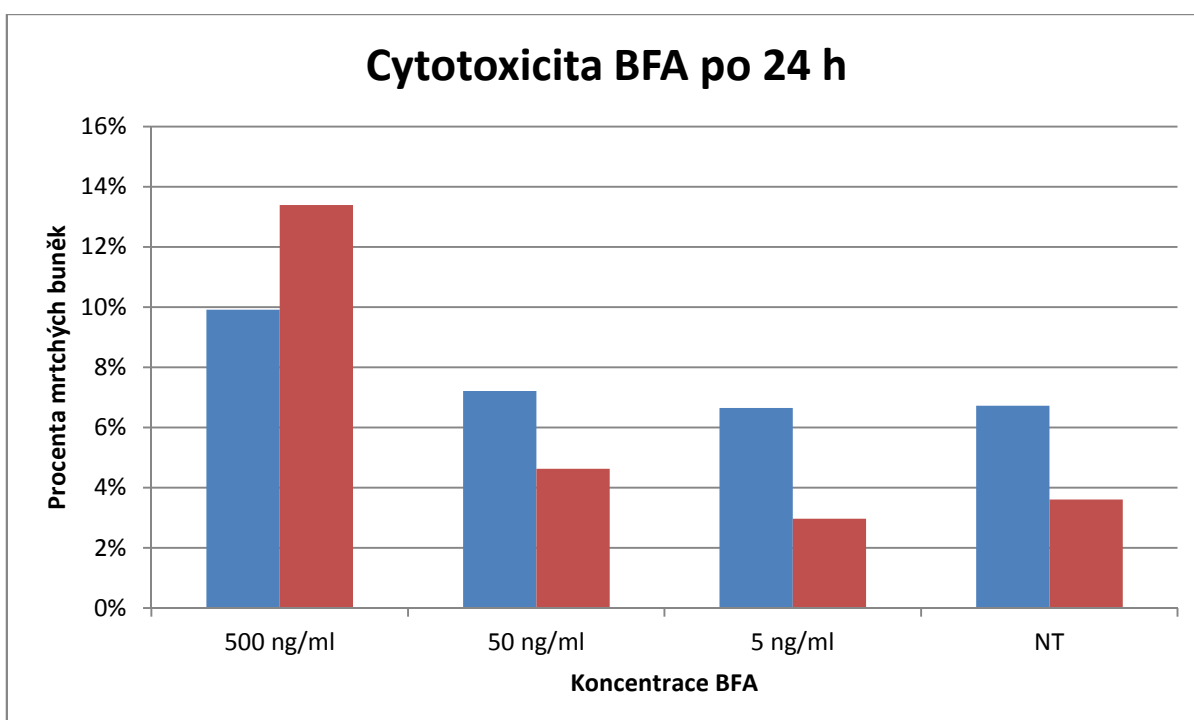
U používaných inhibitorů retrográdního transportu (Golgicid A a Brefeldin A) byla změřena míra jejich cytotoxicity. Byla využita komerční souprava „CytoTox 96® NonRadioactive Cytotoxicity Assay“ (Promega). Procento mrtvých buněk bylo zjištěno změřením aktivity laktát dehydrogenázy (LDH) uvolněné v médiu vztažené na celkovou aktivitu LDH v buňkách po lyzování Tritonem X-100. Po přidání chromogenního substrátu (tetrazoliová sůl + diaphoráza) vzniká aktivitou LDH červený produkt formazan. Změřená absorbance při 490 nm je úměrná aktivitě LDH. Měření cytotoxicity po 24 h odpovídá času po infekci, po kterém měly být buňky testovány na přítomnost LT antigenu.

Pro zjištění efektu GCA na MPyV infekci byly buňky linie 3T6 ve 14. pasáži nasazeny na 24-jamkový panel. Další den bylo vyměněno médium (DMEM s FBS a ATB) za nové a byl přidán inhibitor v koncentracích 0  $\mu$ M (NT; non-treated), 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 50  $\mu$ M). Po 24 h kultivace byla měřena cytotoxicita. Míra změřené cytotoxicity v procentech mrtvých buněk je znázorněna na grafu 5.1.





**Graf 5.1 Cytotoxicita GCA.** Graf vyjadřuje procenta mrtvých 3T6 buněk 24h od přidání inhibitoru. Provedeno v duplikátech. NT = kontrola bez přidání inhibitoru.



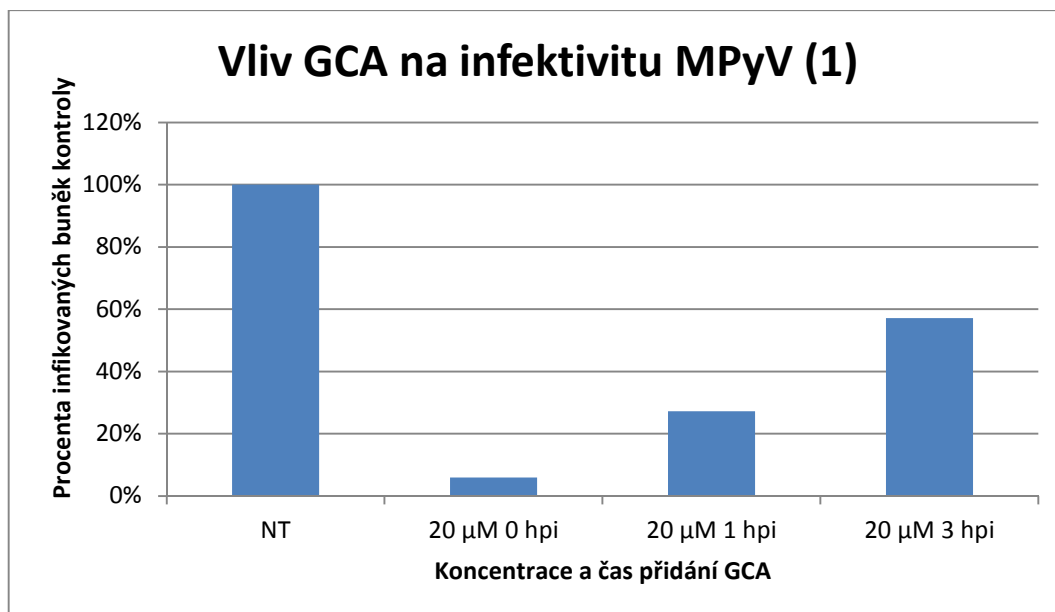
**Graf 5.2. Cytotoxicita BFA.** Graf vyjadřuje procenta mrtvých buněk 24h po přidání inhibitoru. Provedeno v duplikátech. NT = kontrola bez přidání inhibitoru.

Pro změření cytotoxicity BFA byly též vysety buňky linie 3T6 (17. pasáž) na 24-jamkový panel. Druhý den bylo vyměněno médium (DMEM s FBS a ATB) za nové a byl přidán BFA v koncentracích 500 ng/ml, 50 ng/ml, 5 ng/ml a bez inhibitoru (NT). Míra cytotoxicity po 24 h od přidání inhibitoru je ukázána na grafu 5.2.

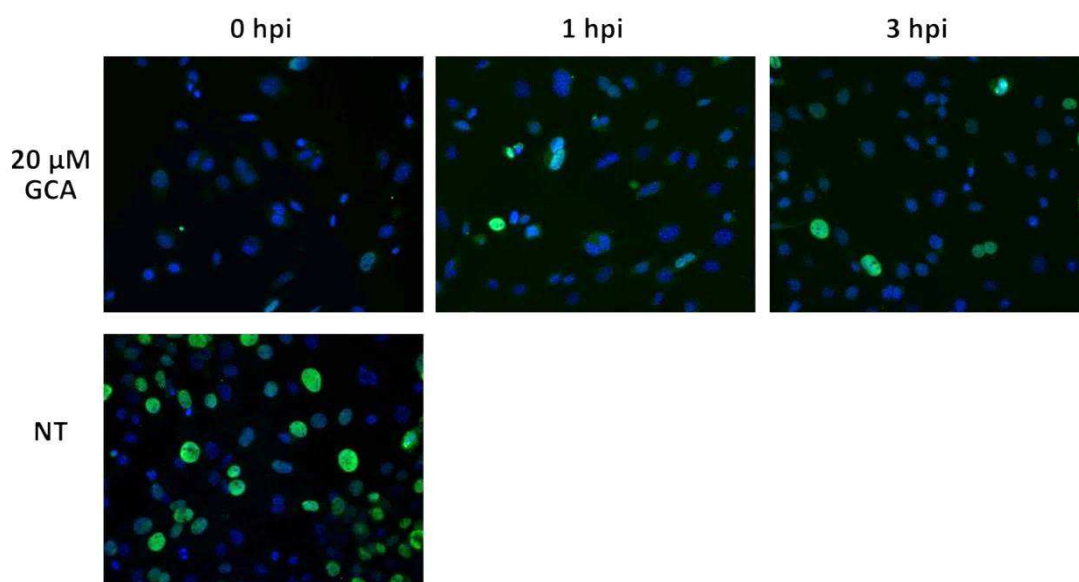
U GCA pozorovaná cytotoxicita nepřesahovala 10% pro koncentrace 5  $\mu$ M a 10  $\mu$ M. Pro dále používanou koncentraci 20  $\mu$ M hodnota cytotoxicity dosahovala průměrně asi 21% a pro koncentraci 50  $\mu$ M cca 25-30 %. Koncentrace GCA 20  $\mu$ M byla zvolena podle studie (Day et al. 2013). Pro BFA ani v nejvyšší používané koncentraci nepřesahovala cytotoxicita 14%. Koncentrace 500 ng/ml byla zvolena podle (Mannová & Forstová 2003). S touto mírou cytotoxicity bylo nutné počítat při výsevu buněk.

### **5.2.2 Vliv Golgicidu A (GCA) na infekci MPyV**

Buňky linie 3T6 v 10. pasáži byly ponechány narůst na mikroskopických sklíčkách ve 24-jamkovém panelu. Další den byly infikovány myším polyomavirem o multiplicitě  $moi = 1$  (viz kapitola 4.11.7). Pro synchronizaci infekce byl panel s buňkami po přidání viru inkubován na ledu 40 min, kdy se virus adsorboval na povrch buněk, ale nebyl buňkou internalizován. Potom byly buňky vloženy do termostatu (37 °C), kde probíhala internalizace viru do buněk po dobu 20 minut. Virus, který nevstoupil do buněk, byl poté odmyt a bylo přidáno nové kompletní médium (DMEM s FBS a ATB). V časech 0 hpi, 1 hpi a 3 hpi byl přidán GCA do výsledné koncentrace 20  $\mu$ M. Čas infekce byl počítán od vložení do 37°C. Buňky byly fixovány 24 hpi, metodou nepřímé imunofluorescence značeny protilátkou proti LT antigenu a poté počítány infikované buňky v jednotlivých optických polích fluorescenčního mikroskopu (obr. 5.4.). V tomto prvním pilotním pokusu byla celkem spočítána následovná množství všech, infikovaných i neinfikovaných buněk pro jednotlivé vzorky – NT: 1014; 0 hpi: 466; 1 hpi: 556; 3 hpi: 683. Počet infikovaných buněk v jednotlivých vzorcích byl vztažen vždy na celkový počet buněk. Procento infikovaných buněk bylo normalizováno na procenta infekce u kontrolního vzorku bez přidání GCA (NT) (Graf 5.3.). Hodnota pro vzorek NT byla spočítána jako průměr pro 2 sklíčka. Pozorovaná inhibice infekce byla asi 94% při přidání inhibitoru v čase 0 hpi, 73 % pro čas 1 hpi a 43 % při přidání inhibitoru v čase 3 hpi.

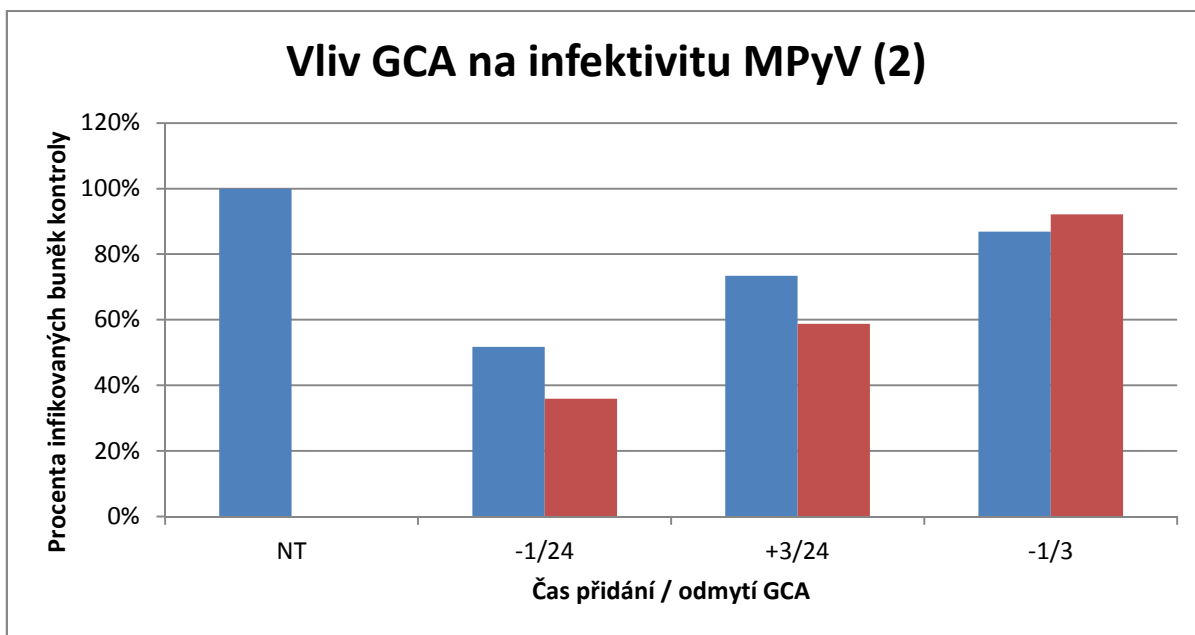


**Graf 5.3. Vliv GCA na infektivitu MPyV (1).** Buňky 3T6 byly infikovány MPyV o  $moi = 1$ . GCA byl přidán v koncentraci 20 µM v časech 0 hpi (zároveň s virem), 1 hpi a 3 hpi a ponechán až do fixace 24 hpi. Buňky byly značeny protilátkou proti LT antigenu. Hodnoty v grafu odpovídají procentům infikovaných z celkového počtu buněk, vztaženo ke kontrole bez inhibitoru (NT).

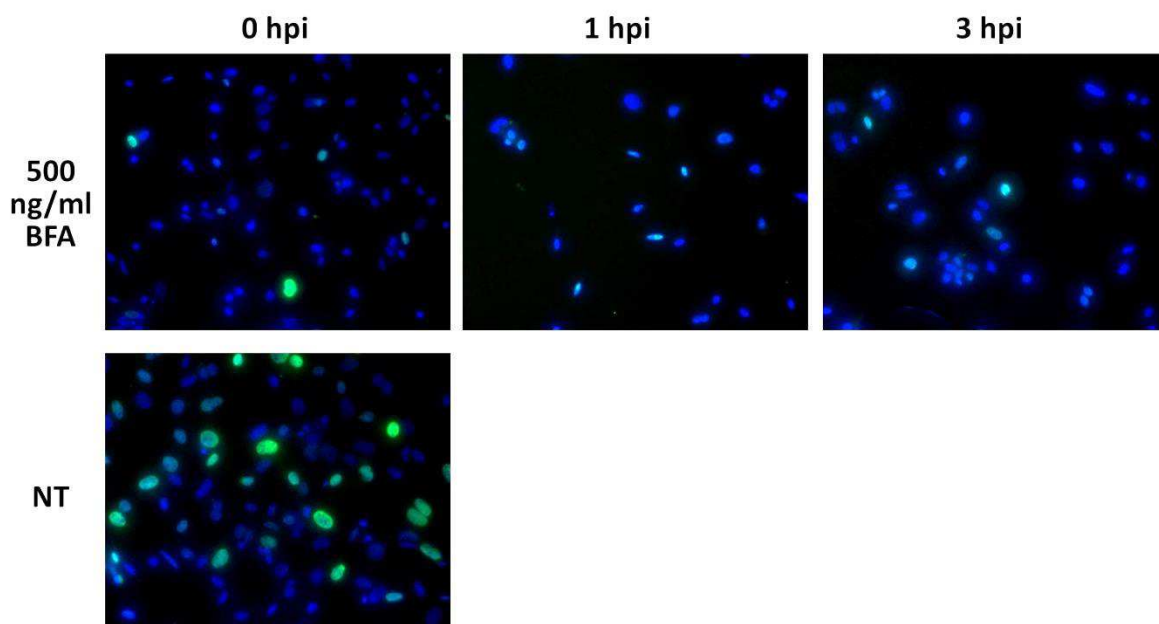


**Obr 5.4. Reprezentativní optická pole z fluorescenčního mikroskopu ke grafu 5.3.** LT antigen značen pomocí krysí monoklonální protilátky (zeleně), DNA značena modře (DAPI). NT – kontrolní infikované buňky bez přidání inhibitoru.

Pokus byl opakován v duplikátech, přičemž byla testována navíc i reverzibilita tohoto inhibitoru. Buňky 3T6 byly v 6. pasáži nasazeny na mikroskopická sklíčka. Další den probíhala infekce. Ke vzorkům -1/3 a -1/24 byl přidán GCA (ve výsledné koncentraci 20  $\mu$ M) GCA 1 h před infekcí. Poté byly buňky infikovány MPyV o  $moi = 1$ . Probíhala adsorpce viru na ledu 40 min a internalizace ve 37 °C 20 min. Poté byl virus odmyt. U vzorku -1/3 byl inhibitor odmyt 3 hpi. Byla testována jeho reverzibilita. U vzorku -1/24 byl inhibitor přítomen až do doby fixace, t.j. 24 hpi (odpovídá tedy vzorku 0 hpi předchozího experimentu s rozdílem 1hodinové preinkubace s inhibitorem). Ke vzorku +3/24 byl GCA přidán v době 3 hpi (odpovídá vzorku 3 hpi v předchozím experimentu). Buňky byly po fixaci značeny protilátkou proti LT antigenu (obr. 5.5). Byly spočítány následovné počty veškerých buněk pro jednotlivé vzorky: NT: 813; vzorek -1/24: 334 a 331; vzorek +3/24: 301 a 300, vzorek -1/3: 517 a 522. Pro NT byla spočítána průměrná hodnota ze dvou sklíček. Procenta infikovaných buněk (z celkového počtu buněk) byla vztažena na kontrolní vzorek, ke kterému nebyl přidán inhibitor (NT), viz graf 5.4.



**Graf 5.4. Inhibice MPyV infekce inhibitorem GCA (2).** Buňky 3T6 byly infikovány MPyV o  $moi = 1$ . Inhibitor (20  $\mu$ M GCA) byl přidán 1 hod před infekcí (do vzorků -1/3 a -1/24) nebo 3 hpi (vzorek +3/24). Inhibitor byl ponechán v médiu až do doby fixace buněk - 24hpi u vzorků -1/24 a +3/24 nebo odmyt 3 hpi (u vzorku -1/3). NT – kontrolní vzorek infikovaných buněk bez přidání inhibitoru. Hodnoty v grafu byly počítány jako procenta infikovaných buněk (z celkového počtu) vztažené na kontrolu bez inhibitoru.

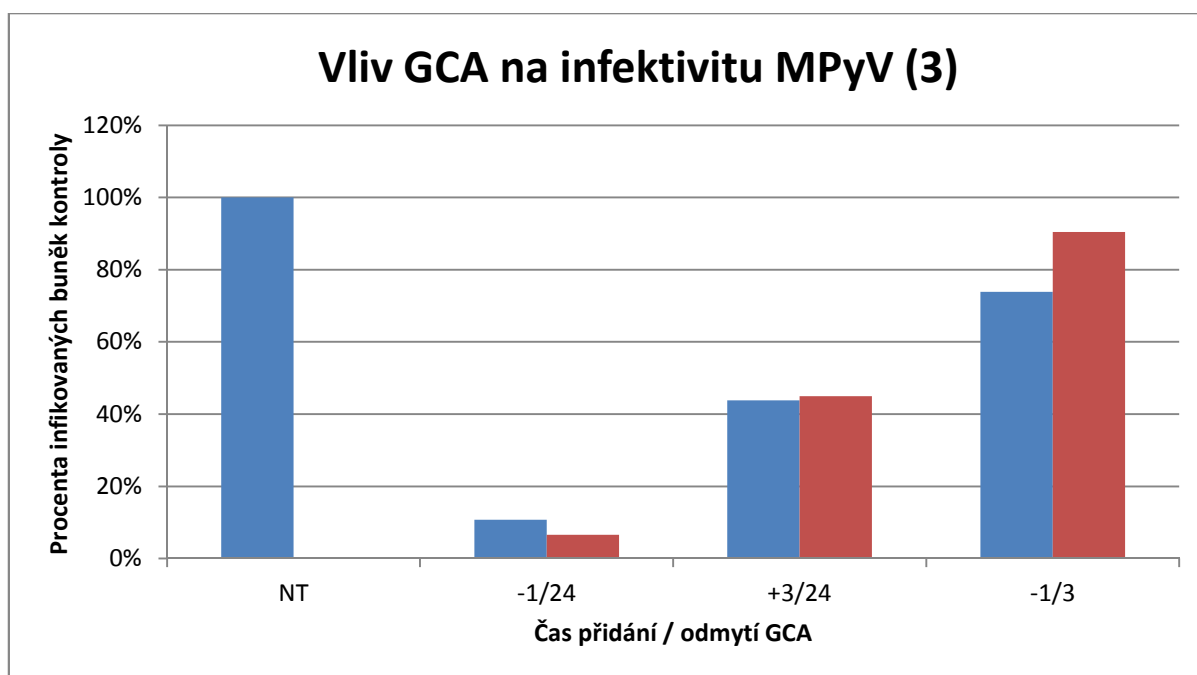


**Obr. 5.5. Reprezentativní optická pole z fluorescenčního mikroskopu ke grafu 5.4. LT antigen značen pomocí krysí monoklonální protilátky (zeleně), DNA značena modře (DAPI). NT – kontrolní infikované buňky bez přidání inhibitoru.**

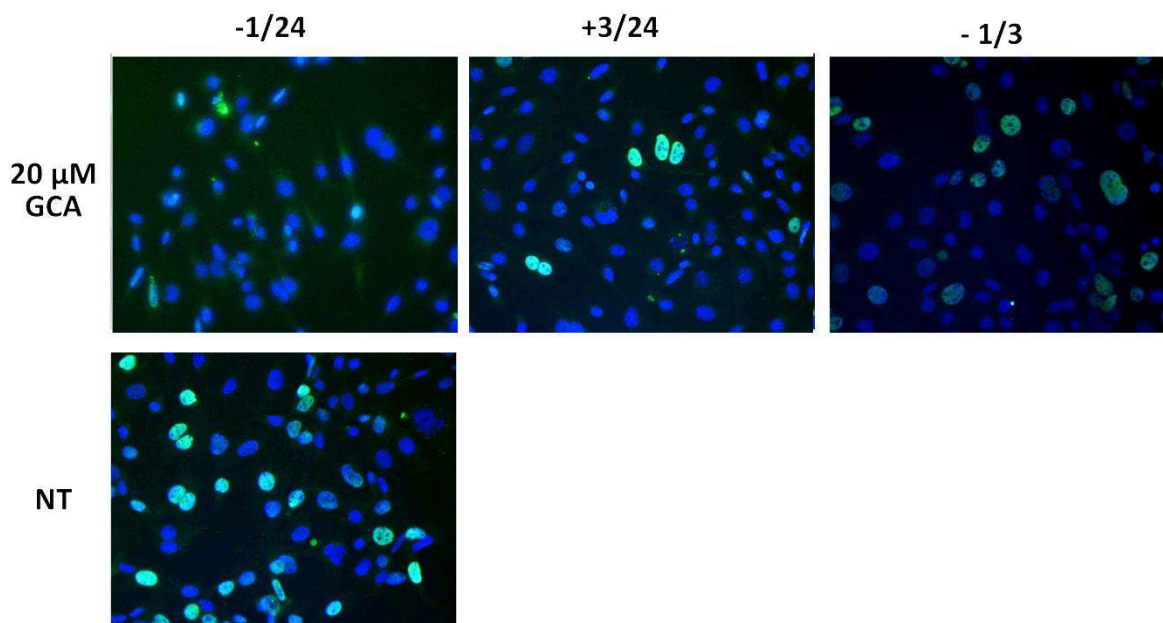
I tento pokus ukázal inhibici MPyV infekce, avšak výrazně nižší, než jaká byla pozorována v předchozím pokusu. Když byl GCA přítomný celý čas infekce, docházelo asi k 56% inhibici infekce (oproti 94% v předchozím pokusu). Při přidání inhibitoru 3 hpi inhibice dosahovala přibližně 34% (oproti 43% v předchozím pokusu). Tento pokles inhibice, lze pravděpodobně vysvětlit tím, že alikvót použitého GCA ztratil potenci několikerým zmražením a rozmražením.

U vzorku -1/3 ve kterém byl inhibitor odmyt 3 hpi došlo jen k mírnému poklesu infekivity (o cca 11 %), což jednak potvrzuje reverzibilitu inhibice tímto inhibitorem, jednak naznačuje, že virus, který byl patrně zastaven na produkční dráze, nebyl směřován k degradaci, ale po odmytí inhibitoru mohl v této dráze pokračovat.

Vzhledem k rozdílné míře inhibice infekce MPyV v prvním a druhém pokusu, byl druhý experiment zopakován v duplikátech s dosud nerozmrazovaným alikvótem GCA. (Graf 5.5, obr. 5.6). Bylo spočítáno následovné množství buněk: NT: 879; vzorek -1/24: -382 a 328; vzorek +3/24: 558 a 428; vzorek -1/3: 558 a 454. Pro NT byl brán průměr počítaný ze dvou sklíčků. Počet infikovaných buněk vyjádřený v procentech z celkového počtu buněk byl vztažen na kontrolu bez přidání inhibitoru (NT).



**Graf 5.5. Inhibice MPyV infekce inhibitorem GCA (3).** Buňky 3T6 byly infikovány MPyV o  $moi = 1$ . Inhibitor (20  $\mu M$  GCA) byl přidán 1 hod před infekcí (vzorky -1/3 a -1/24) nebo 3 hpi (vzorek +3/24). Inhibitor byl ponechán v médiu až do doby fixace buněk - 24hpi (vzorky -1/24 a +3/24) nebo odmyt 3 hpi (vzorek -1/3). NT – kontrolní vzorek infikovaných buněk bez přidání inhibitoru. Hodnoty v grafu byly počítány jako procenta infikovaných buněk z celkového počtu vztažené na kontrolu bez inhibitoru.



**Obr. 5.6** Reprezentativní optická pole z fluorescenčního mikroskopu ke grafu 5.5. LT antigen značen pomocí krysí monoklonální protilátky (zeleně), DNA značena modře (DAPI). NT – kontrolní infikované buňky bez přidání inhibitoru.

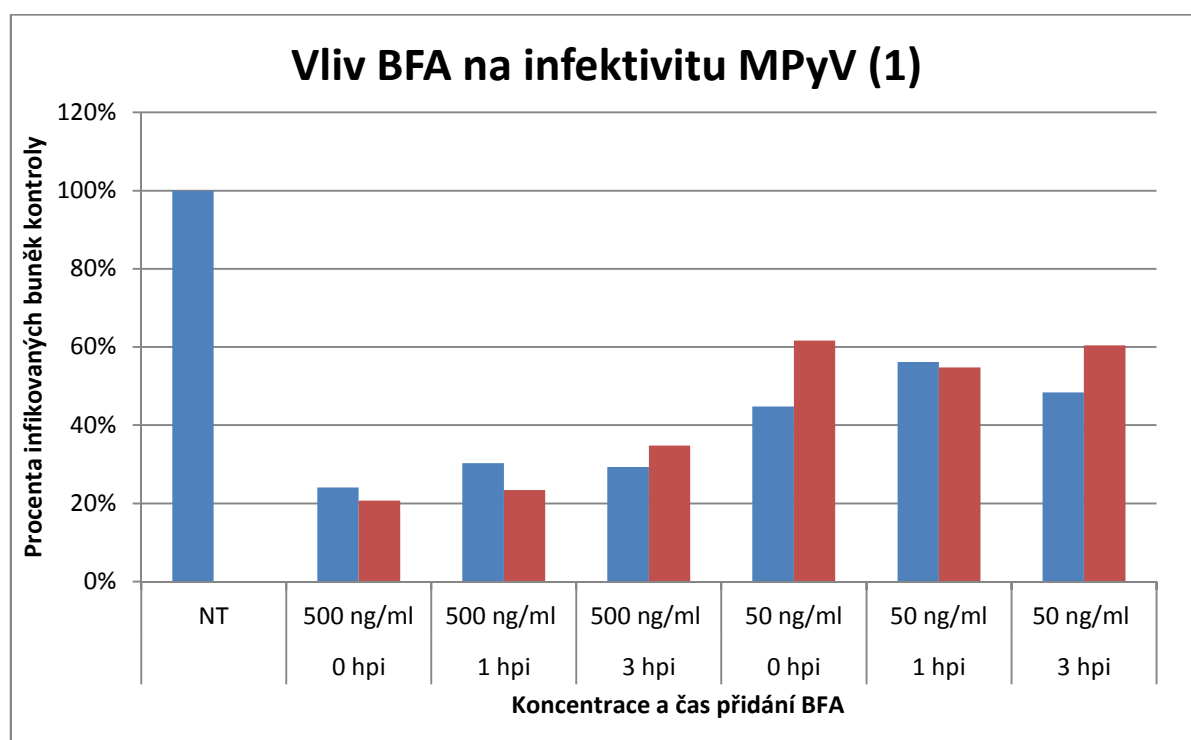
Při odmytí inhibitoru po 3 hpi (-1/3) byl pozorován návrat infekivity obdobně, jak u předchozího experimentu č. 2 (snížení infekivity jen asi o 18 %). V případě, že GCA byl přítomen po celou dobu infekce, docházelo k asi 91% inhibici (94% v pokusu 1). Po přidání v čase 3 hpi byla pozorována inhibice 56 % (43% v pokusu 1) oproti kontrole.

Výsledky inhibičních pokusů s GCA ukazují, že rozložení struktury TGN a GA a zablokování transportu pomocí COPI váčků vede k inhibici infekce MPyV. Vzhledem k tomu, že MPyV nebyl nikdy pozorován v GA (Mannová & Forstová 2003), pokus naznačuje, že tento virus při svém transportu do ER prochází TGN. Pokud byl inhibitor přidán v pozdějším čase než před infekcí nebo zároveň s infekcí docházelo k nárůstu infekivity. Část virionů už prošla produktivní drahou, která byla poté inhibována, což je zejména patrné při času přidání inhibitoru 3 hpi.

### 5.2.3 Vliv Brefeldinu A (BFA) na infekci MPyV

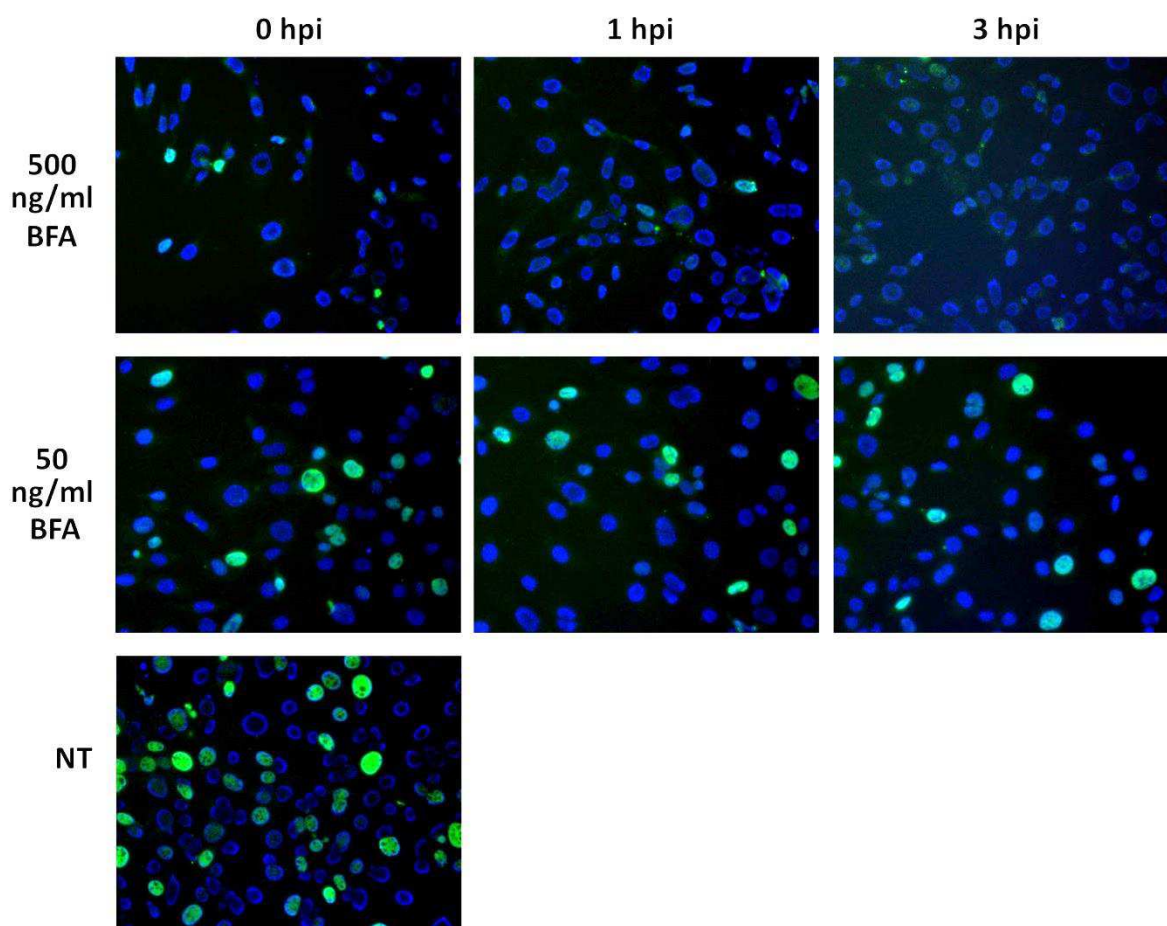
Vliv BFA na infekci MPyV byl již zkoumán, ale s odlišnými výsledky (Gilbert & Benjamin 2004; Mannová & Forstová 2003). Proto jsme se rozhodli vliv tohoto inhibitoru na MPyV infekci znovu přezkoumat. Byly zvoleny koncentrace 500 ng/ml podle původní studie zabývající se vlivem BFA na MPyV (Mannová & Forstová 2003) a koncentrace 50 ng/ml podle studie na HPV16 (Day et al. 2013).

Fibroblasty 3T6 (8. pasáž) narostlé na mikroskopických sklíčkách byly následující den infikovány MPyV o multiplicitě  $moi = 1$ . Virus byl adsorbován na buněčný povrch 40 min inkubací na ledu. Viriony byly internalizovány po 20 min při 37 °C, poté byl zbylý virus odmyt. BFA byl přidán v časech 0 hpi (zároveň s virem), 1 hpi a 3 hpi. Inhibitor zůstal přítomen až do fixace buněk 24 hpi. Následně byl imunofluorescenčně značen LT antigen a byly počítány infikované buňky (obr. 5.7).



**Graf 5.6. Vliv BFA na infekci MPyV (1).** BFA byl přidán v koncentraci 500 ng/ml nebo 50 ng/ml v časech 0 hpi (zároveň s virem), 1 hpi a 3 hpi a ponechán do doby fixace (24hpi). NT =kontrola bez BFA. Imunofluorescenčně značen LT antigen. Poměr infikovaných k celkovému počtu buněk, vztažený ke kontrole NT bez inhibitoru (NT).



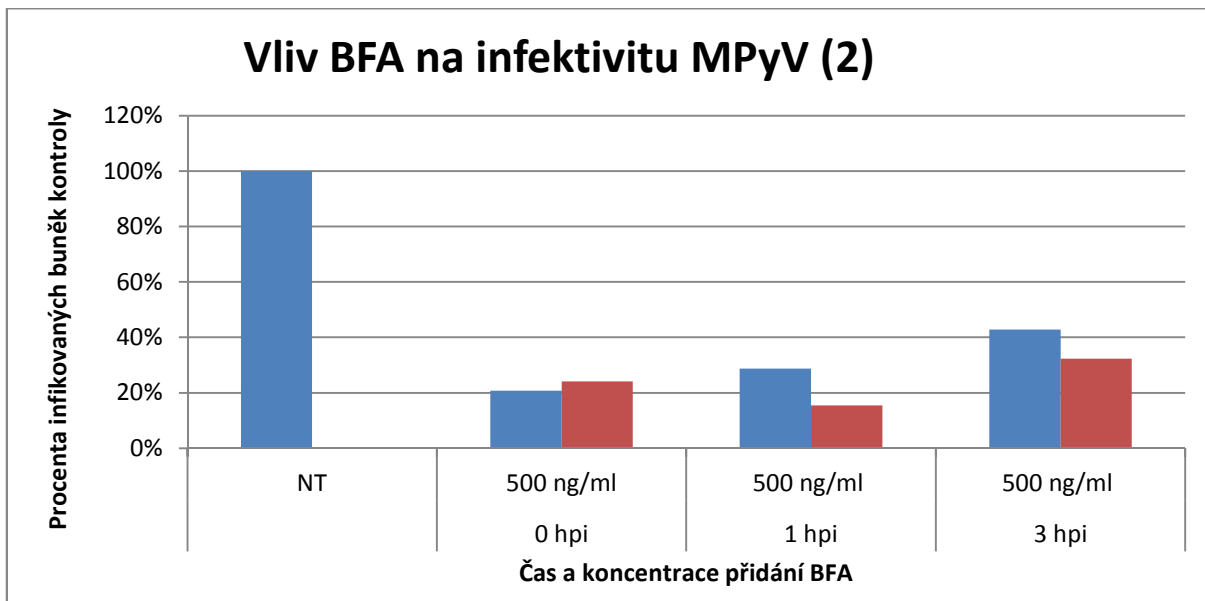


**Obr. 5.7 Reprezentativní optická pole z fluorescenčního mikroskopu ke grafu 5.6.** LT antigen značen pomocí krysí monoklonální protilátky (zeleně), DNA značena modře (DAPI). NT – kontrolní infikované buňky bez přidání inhibitoru.

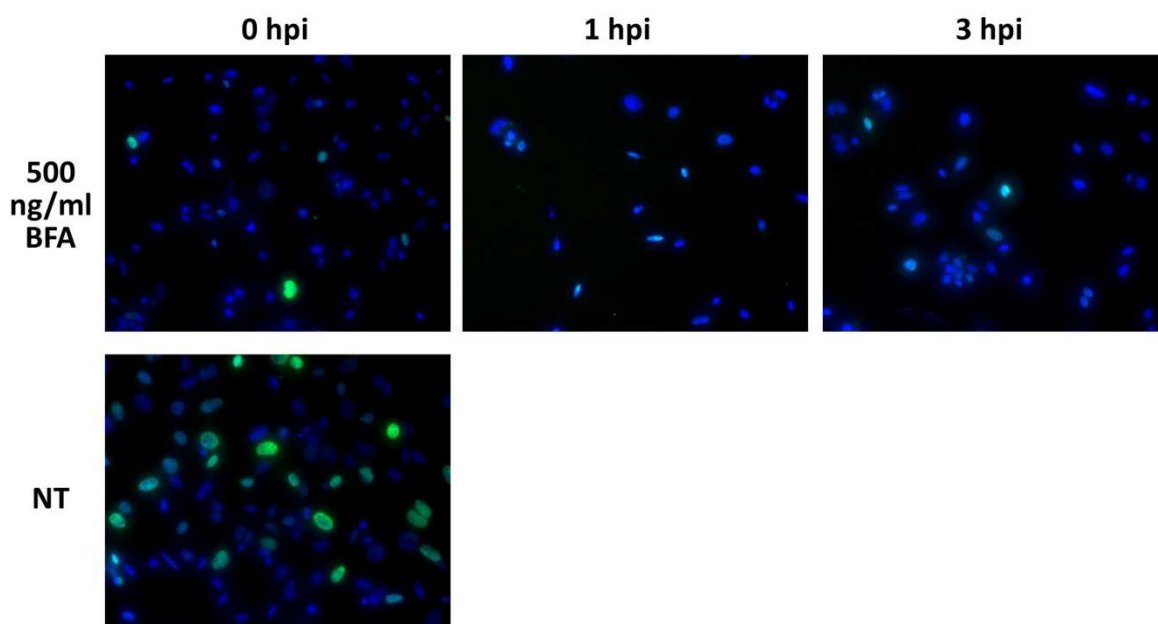
Počet spočítaných buněk v jednotlivých vzorcích byl – NT: 1309; pro koncentraci 500 ng/ml: 0 hpi: 380 a 406; 1 hpi: 343 a 317; 3 hpi: 582 a 341. Pro koncentraci 50 ng/ml: 0 hpi: 568 a 517; 1 hpi: 484 a 451; 3 hpi: 608 a 429. Poměr infikovaných buněk k celkovému počtu, vztažených na procenta kontroly bez inhibitoru, je znázorněn na grafu 5.6. Při použití koncentrace 500 ng/ml docházelo k snížení infekce oproti kontrole o 78% (průměrná hodnota duplikátu) při přidání inhibitoru 0 hpi. Pokud byl inhibitor přidán 1 hpi snížila se infektivita o 73% a pokud byl inhibitor přidán až 3 hpi došlo ke snížení o 68% oproti kontrole. Pro 50 ng/ml BFA v časech 0 hpi, 1 hpi a 3 hpi došlo k 47%, 45% a 46% inhibici.

Pokus byl zopakován pro koncentraci BFA 500 ng/ml Použité 3T6 buňky v 10. pasáži. (obr. 5.8.). Pro jednotlivé vzorky bylo spočítáno celkové množství buněk – NT: 1036; 3 hpi: 369 a 432; 1 hpi: 343 a 306; 0 hpi: 499 a 343. Procento infikovaných buněk vztažených na

kontrolu bez přidaného inhibitoru znázorňuje graf 5.7. Byla pozorována v průměru inhibice 78% pro časy 1 hpi a 0 hpi a 62% pro čas 3 hpi.



**Graf 5.7. Vliv BFA na infekci MPyV (2).** Buňky byly infikovány  $moi=1$ . BFA přidán v koncentraci 500 ng/ml v časech 0 hpi (zároveň s virem), 1 hpi a 3 hpi. Fixováno 24 hpi, značen LT antigen. Graf ukazuje poměr infikovaných k celkovému počtu buněk, vztaženo ke kontrole bez inhibitoru. NT = kontrola bez BFA.



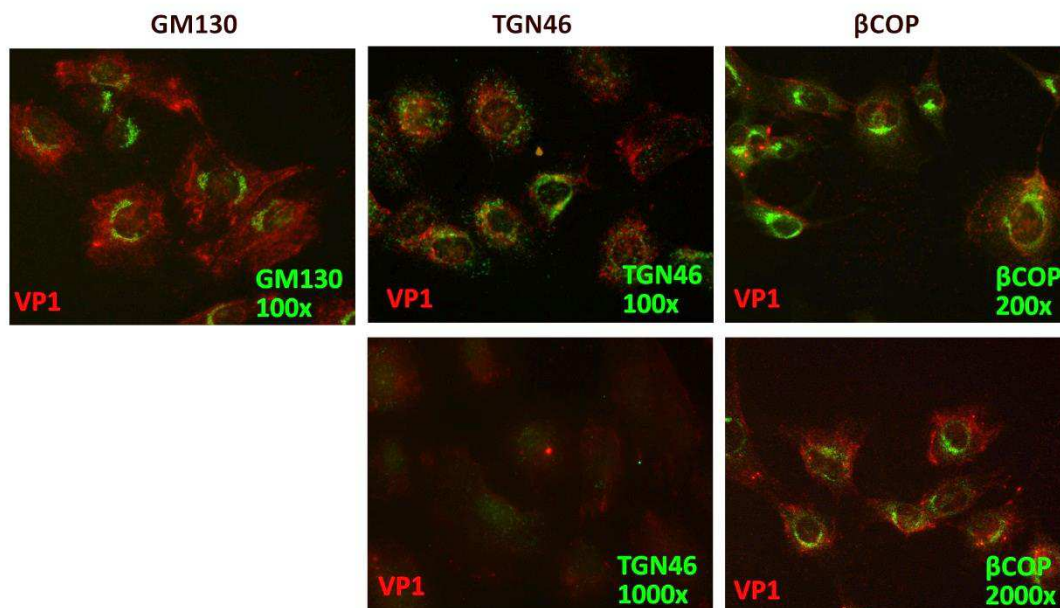
**Obr. 5.8. Vliv BFA na infekci (2).** Reprezentativní obrázky z fluorescenčního mikroskopu. BFA byl přidán v časech 0 hpi, 1 hpi a 3 hpi a ponechán do doby fixace (24 hpi). NT - kontrolní infikované buňky bez přidání inhibitoru. LT antigen značen pomocí kryší monoklonální protilátky (zeleně). DNA značena modře (DAPI).

Inhibiční pokusy prokázaly negativní vliv Brefeldinu A na infekci MPyV. Přestože tento inhibitor není zcela specifický, tyto výsledky, spolu s výsledky inhibičních pokusů s Golgicidem A podporují hypotézu, že MPyV využívá pro produktivní dráhu cestu do ER přes trans-Golgi síťovinu. V následujících pokusech bude tato hypotéza dále prověřována konfokální mikroskopií zjišťováním kolokaliací viru s markery váčků retrográdního transportu.

### 5.3 Studium kolokalizací MPyV s markery retrográdního transportu

Pomocí konfokální mikroskopie lze v buňce pozorovat kolokalizace mezi fluorescenčně značenými objekty. V této diplomové práci byla zkoumána kolokalizace MPyV s markery některých kompartmentů retrográdního transportu. Markerem *trans*-Golgi síťoviny (TGN) je integrální membránový protein TGN46 (u hlodavců označovaný též jako TGN38) (Luzio et al. 1990; Ponnambalam et al. 1996). Typickým proteinem vyskytujícím se v *cis*-Golgi je protein GM130 (Nakamura et al. 1995). Markerem COPI váčků je  $\beta$  podjednotka coatomeru ( $\beta$ COP). Kolokalizace těchto markerů s hlavním strukturním proteinem MPyV byla studována konfokální mikroskopií.

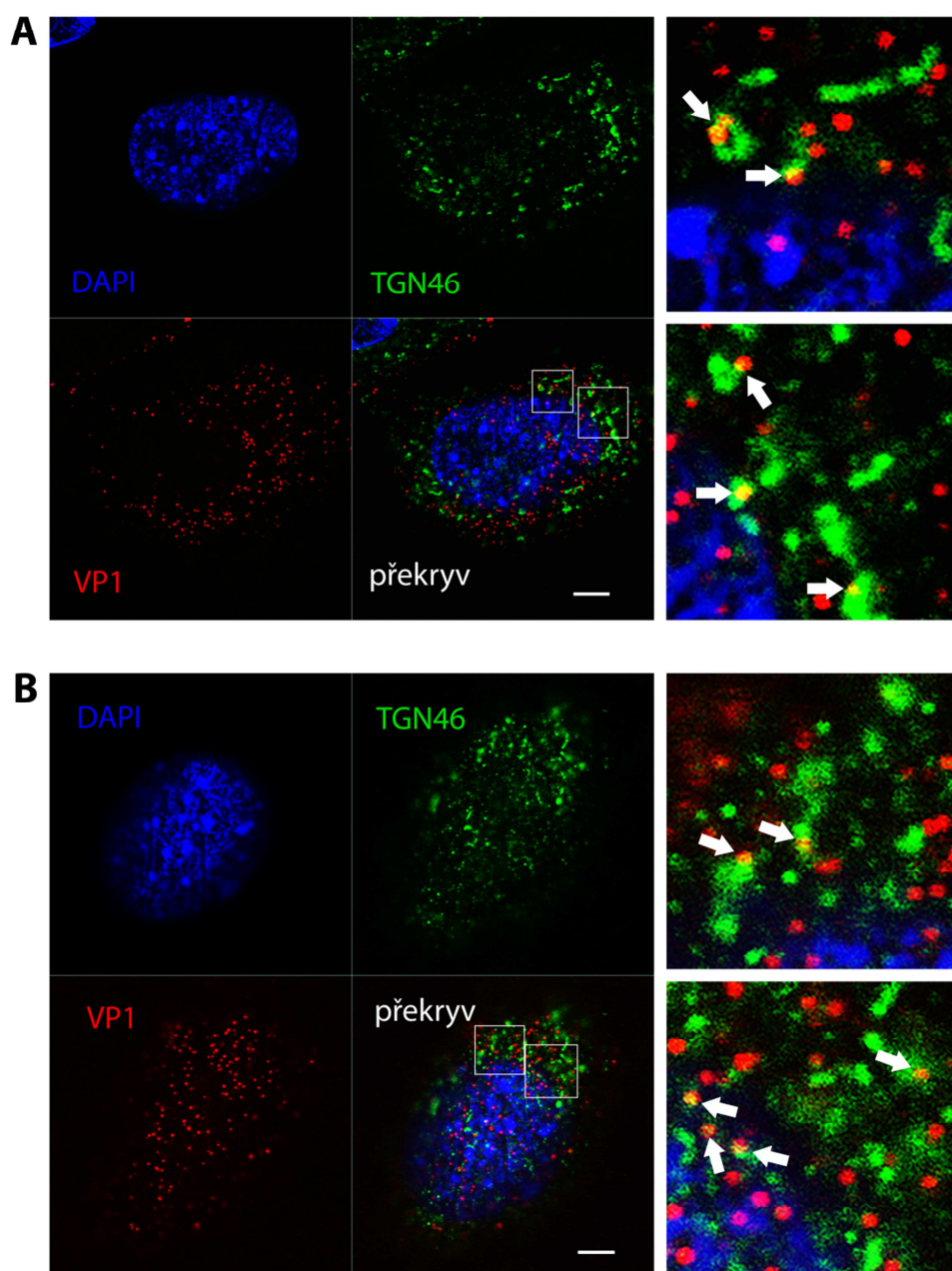
Nejprve byly testovány komerční protilátky proti markerům retrográdního transportu. Pro testování protilátek byly 3T6 buňky (14. pasáž) nechány růst na mikroskopických sklíčkách. Další den byla část infikována MPyV s multiplicitou  $\text{moi} = 1$  (asi 6140 částic na buňku počítáno podle hemaglutinačních jednotek). Vzhledem ke značení VP1 je celkový počet částic směrodatnější. Infekce byla synchronizována (40 min inkubace na ledu a 20 min internalizace ve 37°C, poté odmytí viru). V čase 1 hpi byly buňky fixovány a byl imunofluorescenčně značen kapsidový protein VP1 a buněčný marker. Pro TGN46 bylo zvoleno ředění protilátky 1000x (doporučované výrobcem) a 100x. Pro GM130 bylo zvoleno nejnižší ředění protilátky doporučené výrobcem, 100x. Pro  $\beta$ COP bylo testováno ředění 2000x (doporučené výrobcem) a 200x. Z obrázku 5.9. vyplývá že pro vlastní experiment bude nutno použít pro protilátky proti TGN 46 i  $\beta$ COP řádově nižší ředění než jaké doporučuje výrobce.



**Obr 5.9. Test ředění protilátek.** Snímky z fluorescenčního mikroskopu.. Buňky infikované a fixovány v čase 1 hpi, virové částice značeny protilátkou proti VP1 (červeně) a buněčné markery (zeleně). Testované ředění protilátek je uvedeno v jednotlivých obrázcích.

Pro konfokální mikroskopii byly 3T6 fibroblasty (4. pasáž) infikovány MPyV o multiplicitě  $6 \times 10^3$  nebo  $3 \times 10^3$  virových částic na buňku. Infekce byla synchronizována (viz výše). V časech 1 hpi a 3 hpi byly buňky fixovány a byly imunofluorescenčně označeny protilátkou proti VP1 a danému markeru. Pro TGN46 a GM130 bylo zvoleno ředění protilátky 100x. Pro βCOP bylo použito ředění 200x. Preparáty byly pozorovány na konfokálním mikroskopu, byl použit objektiv se zvětšením 63x s imerzním olejem (obrázky 5.10 až 5.15). Všechny snímky byly získány s multiplicitou viru  $3 \times 10^3$  virových částic na buňku).

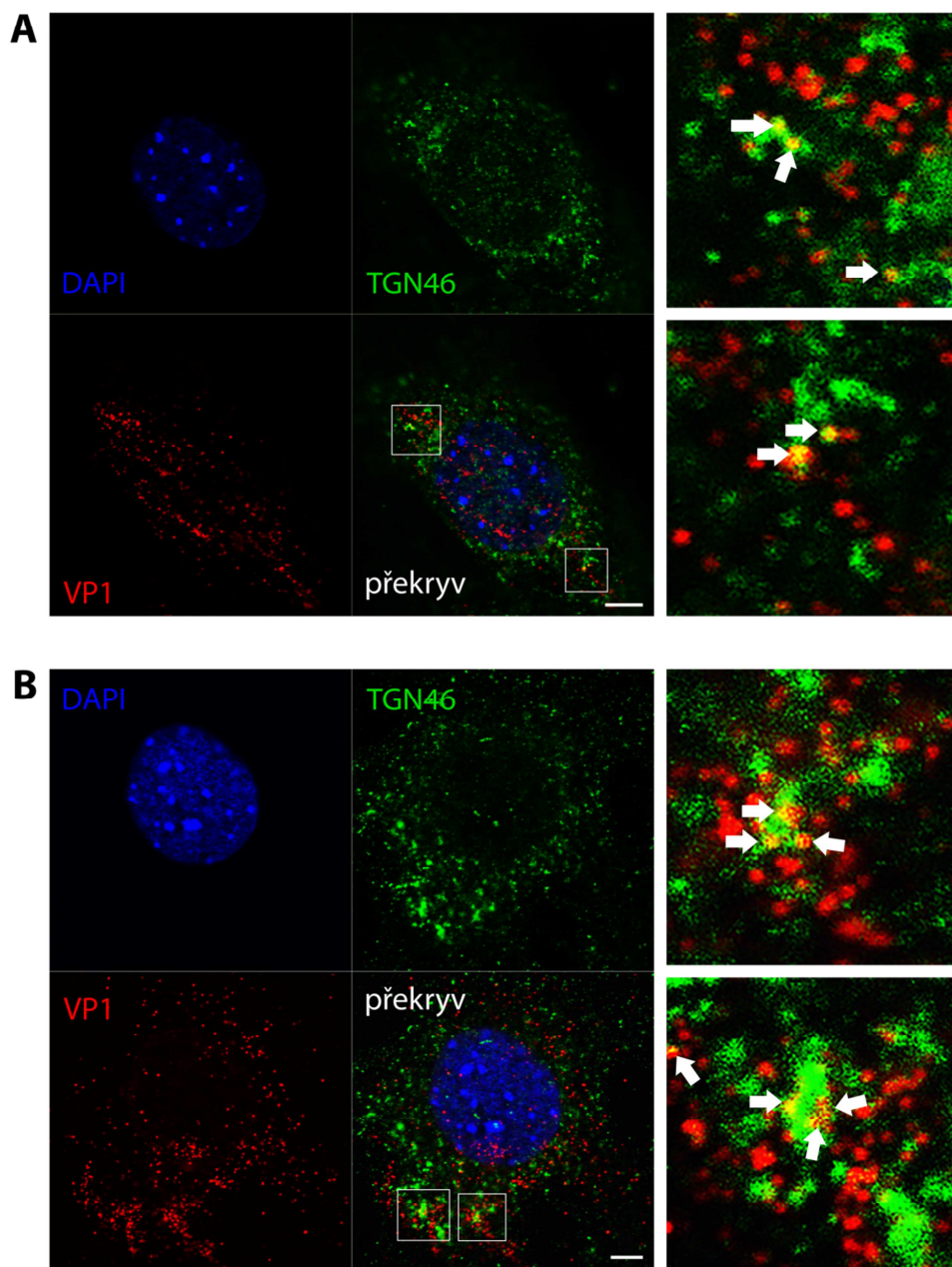
## VP1/TGN46 1 hpi



**Obr. 5.10.** Kolokalizace VP1 (červeně) a TGN46 (zeleně) v čase 1 hpi. Vybrané řezy 2 buněk (A, B). DNA značena modře (DAPI). Bylo použito  $3 \times 10^3$  částic na buňku. Ve zvětšených výřezech jsou šipkami označeny jednotlivé kolokalizace. Úsečka = 5  $\mu\text{m}$ .

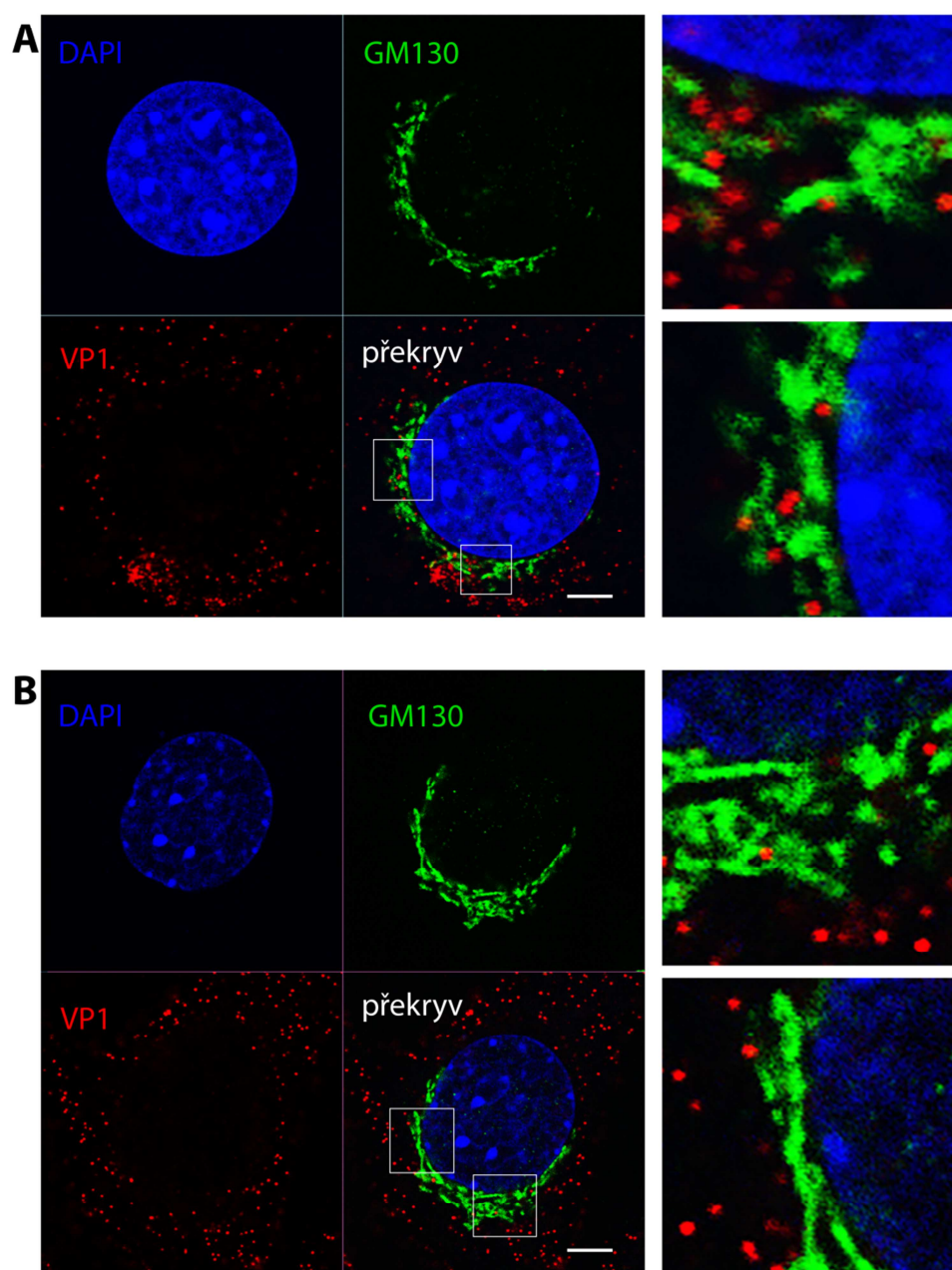


## VP1/TGN46 3 hpi



**Obr. 5.11.** Kolokalizace VP1 (červeně) a TGN46 (zeleně) v čase 3 hpi. Vybrané řezy dvěma buňkami (A, B). DNA značena modře (DAPI). Bylo použito  $3 \times 10^3$  částic na buňku. Ve zvětšených výřezech jsou šipkami znázorněny jednotlivé kolokalizace. Úsečky = 5  $\mu\text{m}$ .

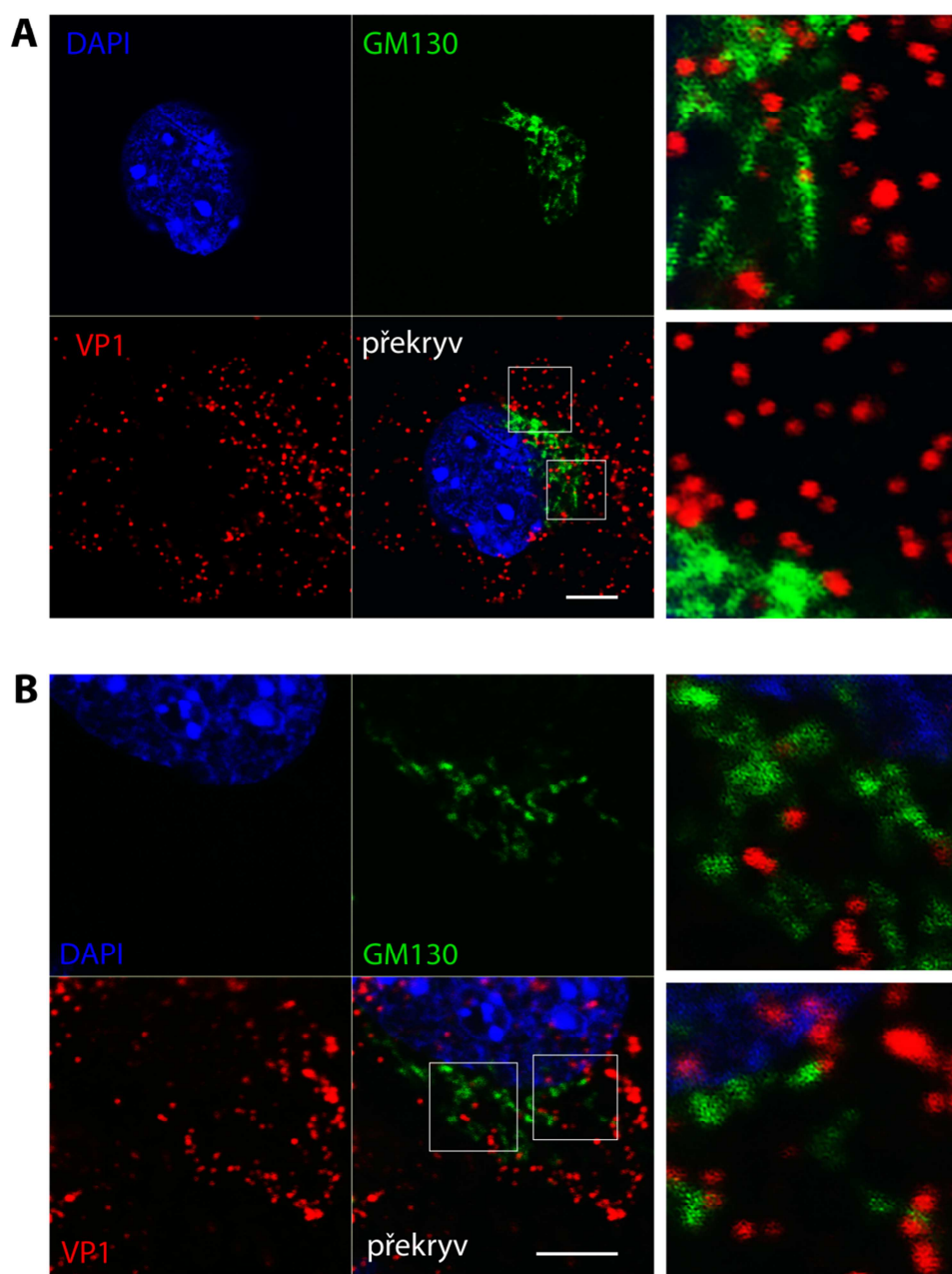
## VP1/GM130 1 hpi



**Obr. 5.12.** Kolokalizace VP1 (červeně) a GM130 (zeleně) v čase 1 hpi. Vybrané řezy 2 buňkami (A, B). DNA značena modře (DAPI). Bylo použito  $3 \times 10^3$  částic na buňku. Zvětšené výřezy jsou v pravém panelu. Úsečky = 5  $\mu\text{m}$ .

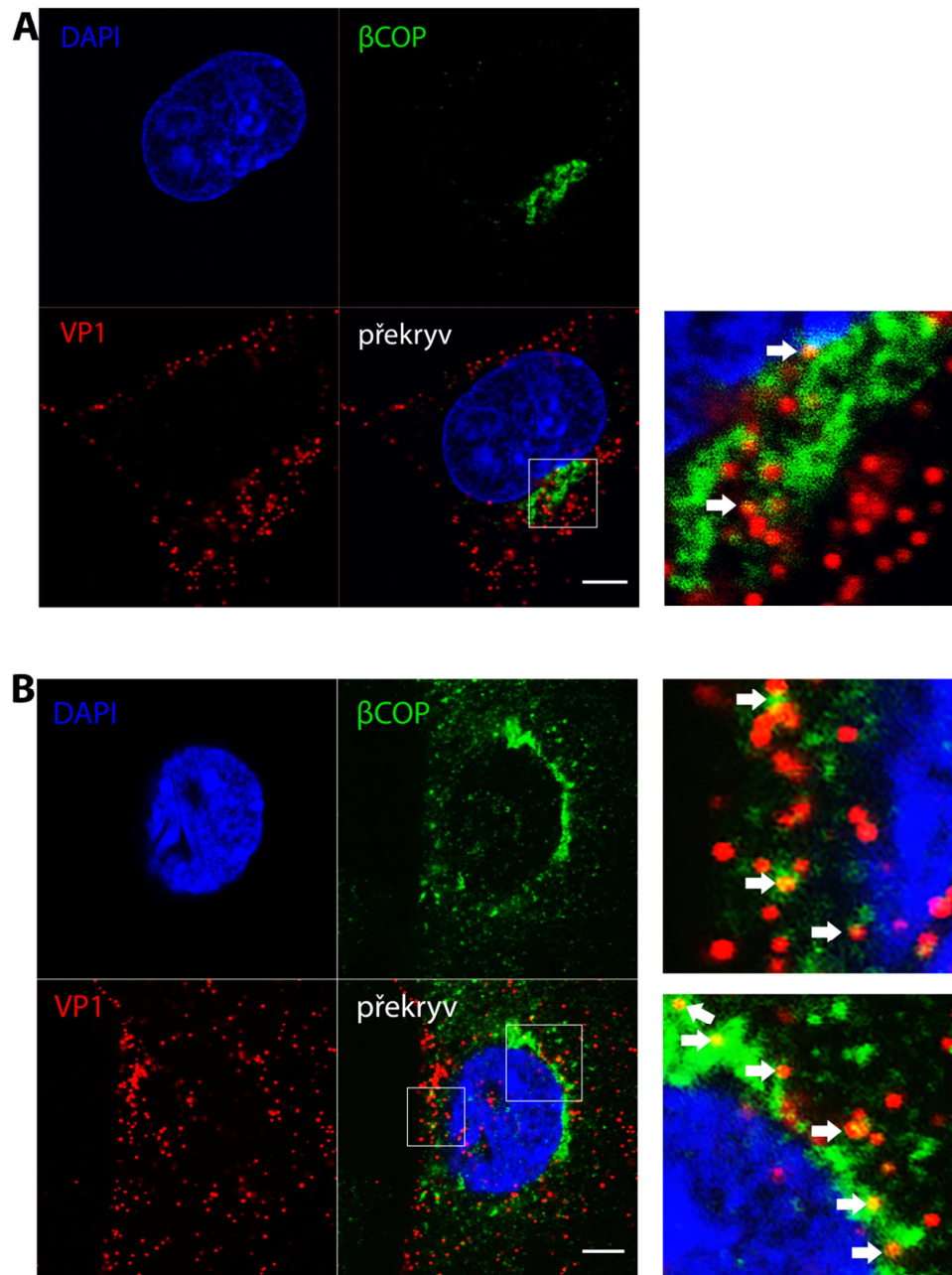


## VP1/GM130 3 hpi



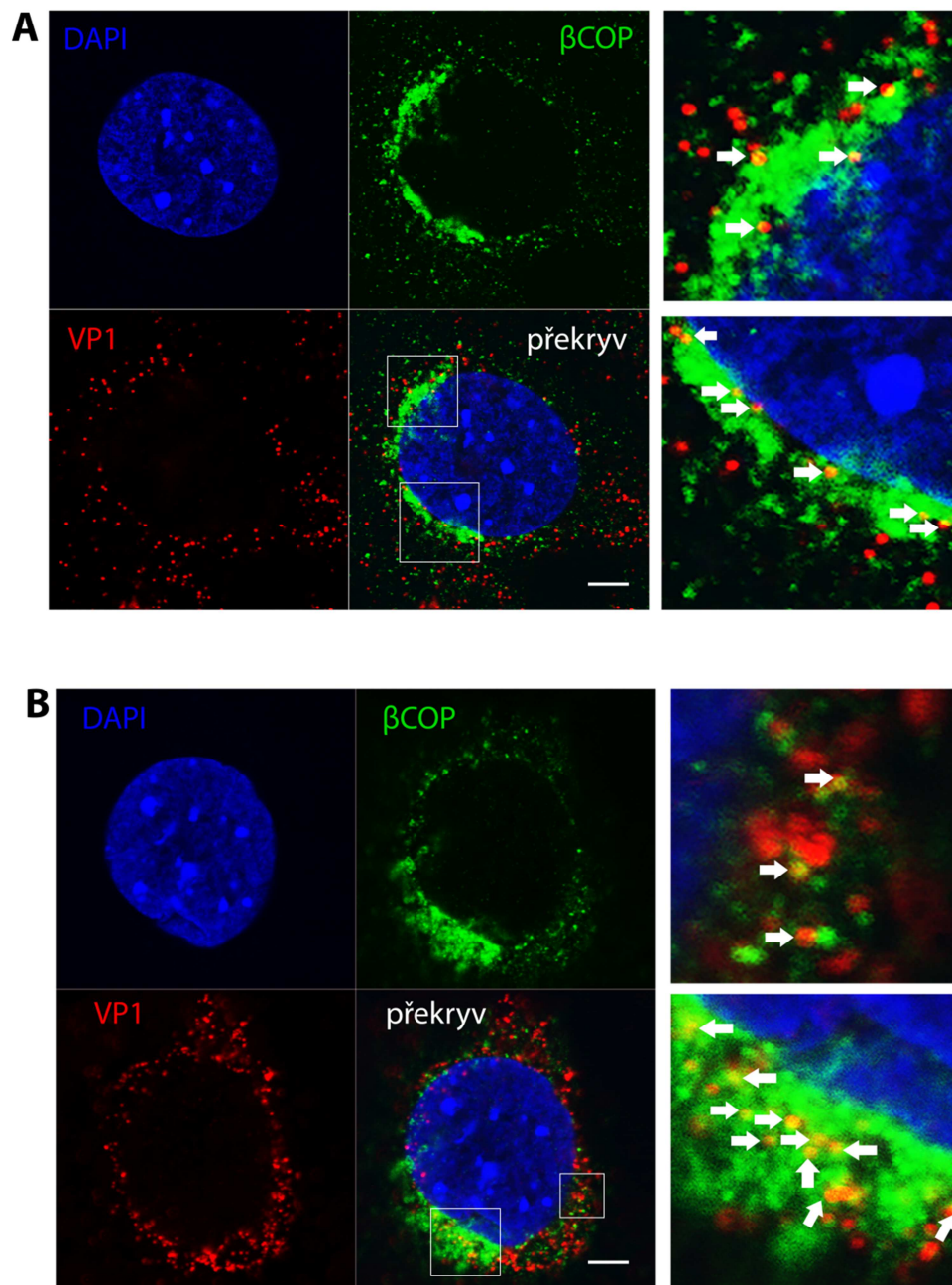
**Obr. 5.13.** Kolokalizace VP1 (červeně) a GM130 (zeleně) v čase 3hpi. Vybrané řezy 2 buňkami (A, B). DNA značena modře (DAPI). Bylo použito  $3 \times 10^3$  částic na buňku. Úsečky = 5  $\mu\text{m}$ .

## VP1/ $\beta$ COP 1 hpi



**Obr. 5.14.** Kolokalizace VP1 (červeně) a  $\beta$ COP (zeleně) v čase 1 hpi. Vybrané řezy 2 buňkami (A, B). DNA značena modře (DAPI). Bylo použito  $3 \times 10^3$  virových částic na buňku. Ve zvětšených výřezech jsou šipkami znázorněny kolokalizace obou sledovaných struktur. Úsečky = 5  $\mu$ m.

## VP1/ $\beta$ COP 3 hpi



**Obr. 5.15.** Kolokalizace VP1 (červeně) a  $\beta$ COP (zeleně) v čase 3hpi. Vybrané řezy 2 buněk (A, B). DNA značena modře (DAPI). Bylo použito  $3 \times 10^3$  virových částic na buňku. Ve zvětšených výřezech jsou šipkami znázorněna místa jednotlivých kolokalizací. Úsečky = 5  $\mu$ m.

Kolokalizace virionů s markerem TGN (TGN46) během jejich transportu do jádra byla pro MPyV zjišťována poprvé. Byly nalezeny kolokalizace části populace virionů jak v čase 1 hpi, tak i 3 hpi. Toto zjištění spolu s pokusy s inhibitory BFA a zvláště GCA naznačuje, že MPyV pro produktivní infekci prochází přes TGN. Jen malá část virionů doručí svůj genom do jádra.

Pro marker *cis*-GA (GM130) byla prohlédnuta řada buněk a u žádné nebyla pozorována kolokalizace s viriony. Sporných bodů bylo minimum. Spolu s ostatními výsledky to naznačuje, že se MPyV *cis*-GA vyhýbá cestou pouze přes TGN.

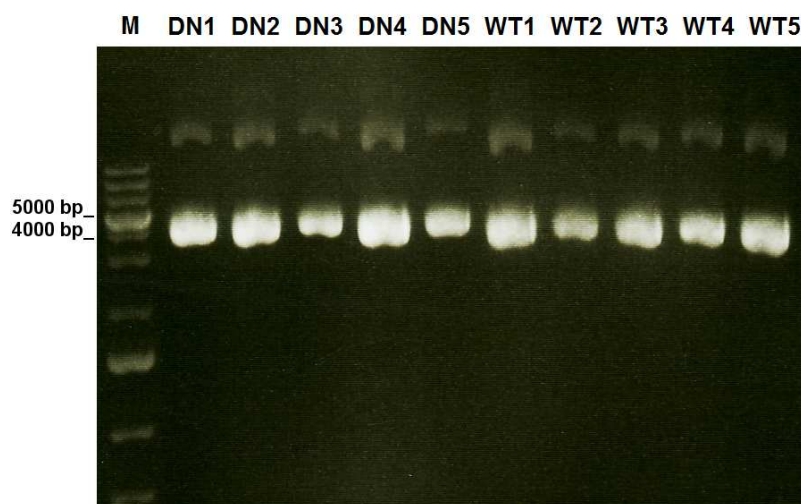
Pro čas 1 hpi i 3 hpi byla nalezena část virionů kolokalizující s  $\beta$ COP. Kolokalizace MPyV s COPI vāčky již byla dříve zjišťována, avšak byla nalezena jen vzácně (Mannová & Forstová 2003). Vzhledem k masivní kolokalizaci ve studii na SV40 (Norkin et al. 2002) byla považována za neprůkaznou. Ovšem protože pouze minoritní část buňkou internalizovaných virionů MPyV je produktivně transportována do jádra (Mannová & Forstová 2003), nedá se patrně masivní kolokalizace s COPI vāčky očekávat.

## 5.4 Zkoumání účasti GTPázy Rab 9 na produktivním transportu MPyV

Malá GTPáza Rab9 je regulátorem jediné dostatečně popsané cesty z pozdních endozomů do TGN. Pro zkoumání, jestli MPyV využívá tuto cestu, byly použity expresní plazmidy pro savčí buňky nesoucí DNA fragment s genem kódujícím Rab9 divokého typu (wt) nebo dominantně negativní mutantu (DN). Dominantně negativní mutantu je typ mutace, kdy nejenže daný protein není funkční, ale zároveň inhibuje exprimovaný protein divokého typu. Obě varianty Rab9 produkované těmito plazmidy jsou fúzované s EGFP. Byl zkoumán vliv nadexprese EGFP-Rab9 wt nebo exprese EGFP-Rab9 DN (t.j. vyřazení funkce této GTPázy) v buňkách na infektivitu MPyV.

### 5.4.1 Izolace plazmidů pro transfekce savčích buněk

Nejprve byly připraveny chemicky kompetentní buňky bakteriálního kmene *E.coli* TOP10. Ty byly transformovány oběma plazmidy tepelným šokem. Selektce transformantů probíhala na miskách s živným agarem pomocí kanamycinu. Vybrané bakteriální kolonie (DN, wt 1-5) byly přechárkovány. Část narostlé kultury byla použita pro izolaci plazmidů pomocí komerční soupravy „GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit“ (Sigma-Aldrich). Ze zbylé kultury byly připraveny bakteriální konzervy. Kvalita izolace plazmidů byla ověřena elektroforeticky na agarózovém gelu (obr. 5.16). Velikost obou plazmidů je 5378 bp. Koncentrace plazmidové DNA byla změřena spektrofotometricky.

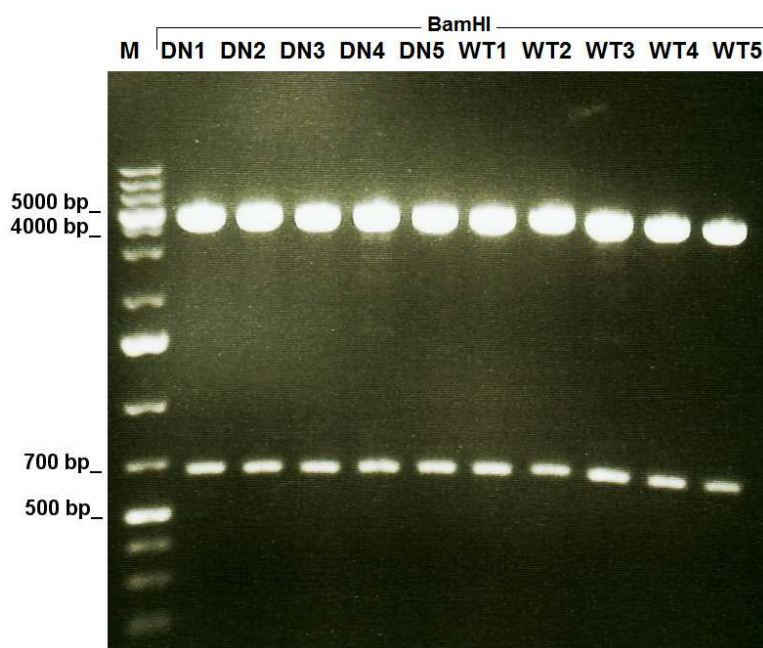


**Obr. 5.16.** Expresní plazmidy pro produkci EGFP-Rab9 DN nebo wt po izolaci z bakterií minipreparací. M = marker.

U obou plazmidů je fragment nesoucí gen pro wt nebo DN Rab9 zaklonovaný přes restrikční místo BamHI. Pro kontrolu izolace plazmidů byl u obou vyštěpen fragment touto restrikční endonukleázou. Na agarózové elektroforéze proběhla analýza fragmentů (obr. 5.17). „Backbone“ vektor má velikost 4700 bp. Oba inzerty mají velikost 678 bp. Proužky na gelu

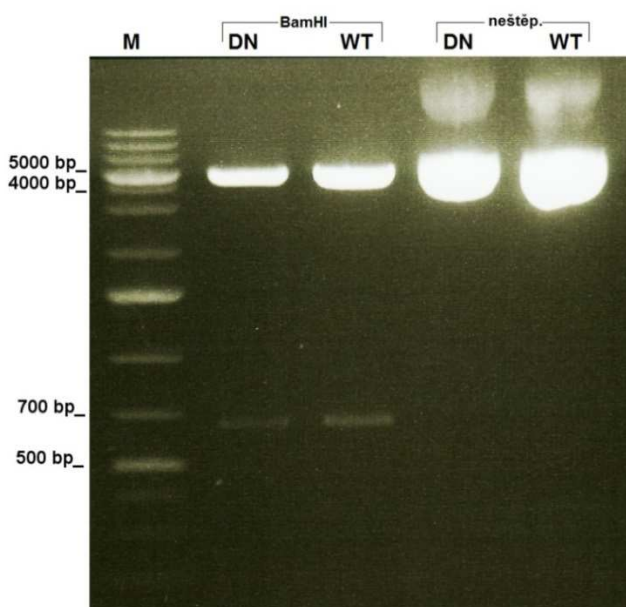


odpovídají svou mobilitou velikosti linearizovaného prázdného vektoru a vyšťepěného inzertu.



**Obr. 5.17.** Plazmidy pEGFP-Rab9 DN a wt štěpené BamHI. Prázdný vektor má velikost 4700 bp a vyšťepené inzerty 678 bp. M = marker.

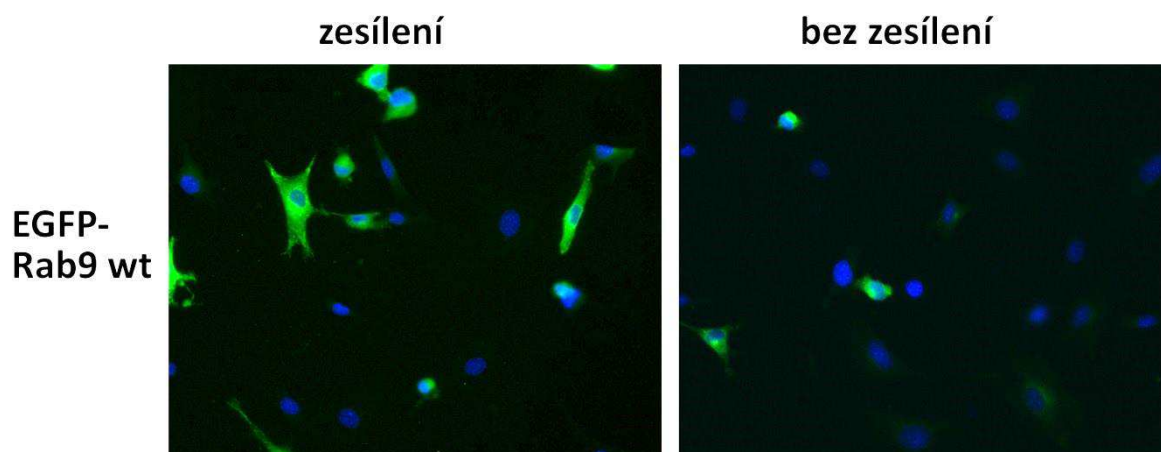
Pro použití plazmidů pro transfekce savčích buněk bylo třeba plazmidovou DNA zbavit bakteriálních endotoxinů. Kolonie „1“ pro wt i DN Rab9 byly použity pro maxipreparaci plazmidové DNA pomocí komerční soupravy „JETSTAR NoEndoMaxikit“ (Genomed). Koncentrace DNA byla změřena spektrofotometricky: Plazmid pEGFP-Rab9 wt měl koncentraci 2413,7 ng/μl; a plazmid pEGFP-Rab9 DN 2957,7 ng/μl. Plasmidy byly ještě ověřeny elektroforeticky po štěpení enzymem BamHI (obr. 5.18).



**Obr. 5.18.** Plazmidy pEGFP-Rab9 DN a pEGFP-Rab9 wt po maxipreparaci, zbavené endotoxinů. Prázdný linearizovaný vektor má velikost 4700 bp, vyšťepené inzerty enzymem BamHI 678 bp. M = marker.

### 5.4.2 Transfekce

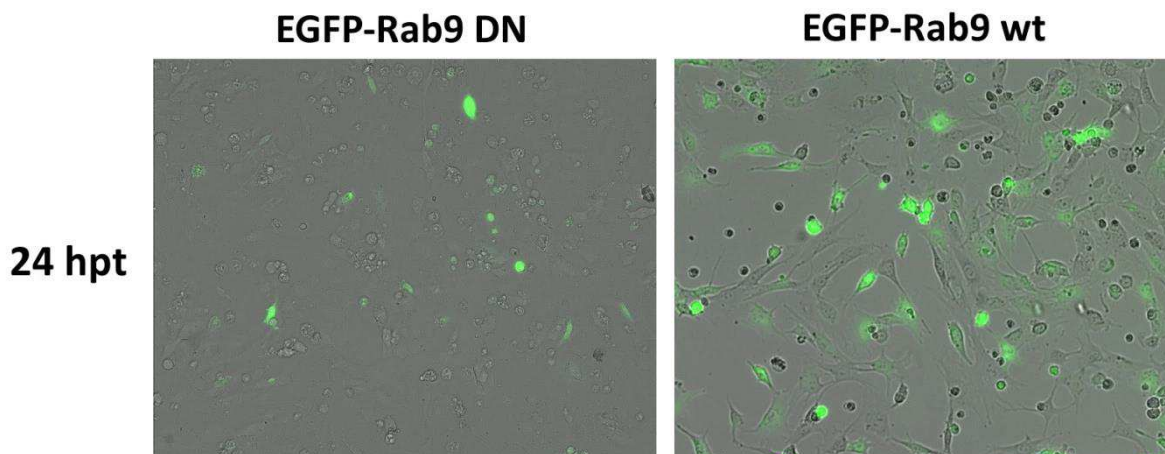
Pro zkušební transfekci byly použity buňky linie 3T6 v 10. pasáži. Byly transfekovány 6  $\mu$ g plazmidu pEGFP-Rab9 wt metodou nukleofekce (Amaxa). U této metody je DNA doručena přímo do jádra, čímž je umožněna vyšší účinnost transfekce. Zároveň je ale aplikací elektrického pulzu usmrceno velké množství buněk. Buňky byly fixovány 24 hpt (hodiny po transfekci). V tomto pokusu byla testována produkce EGFP-Rab9 wt, zda je dostačující, nebo je vhodnější zesílit signál pomocí králičí protilátky proti EGFP konjugované s Alexa Fluor 488 (obrázek 5.19). Účinnost transfekce pro pEGFP-Rab9 wt byla 39% (procento transfekovaných buněk). Signál samotného EGFP-Rab9 wt bez zesílení byl rozeznatelný, avšak při slabší úrovni exprese byl signál hůře viditelný. Při zesílení signálu pomocí protilátky byly všechny transfekované buňky jasně rozeznatelné.



**Obr. 5.19.** Buňky 3T6 transfekované plazmidem pEGFP-Rab9 wt (6  $\mu$ g DNA). Vlevo EGFP-Rab9 wt – signál EGFP zesílen protilátkou proti EGFP Vpravo – signál EGFP bez zesílení. DNA značena modře (DAPI).

### 5.4.3 Transfekce a infekce

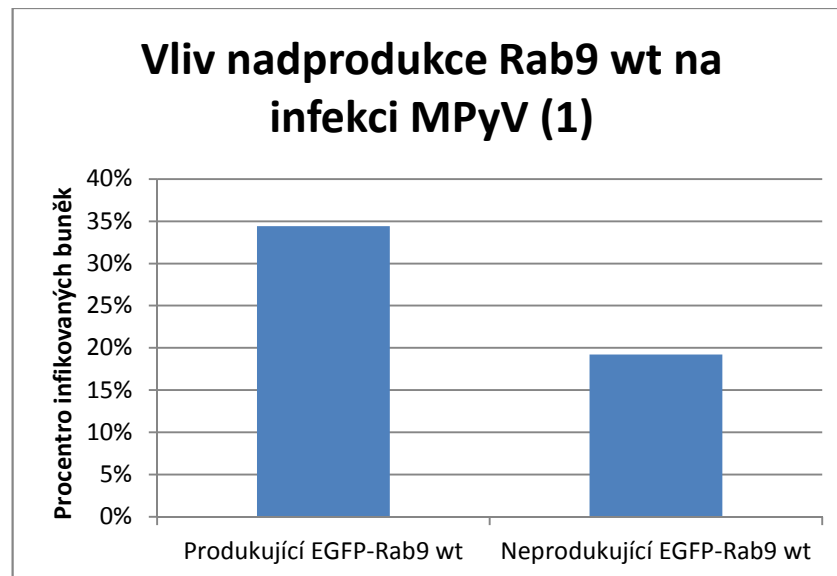
V prvním pokusu o zjištění, zdali se GTPáza Rab9 podílí na produktivním transportu MPyV do jádra, byla transfekce provedena nukleofekcí (Amaxa). Každý z obou plazmidů pEGFP-Rab9 wt i pEGFP-Rab9 DN byl transfekován v množství 6  $\mu$ g do 3T6 buněk (13. pasáž). V čase 24 hpt byla pozorována exprese obou s EGFP fúzovaných produktů, ale buňky transfekované plasmidem pro expresi EGFP-Rab9 DN vykazovaly změny v morfologii (obrázek 5.20).



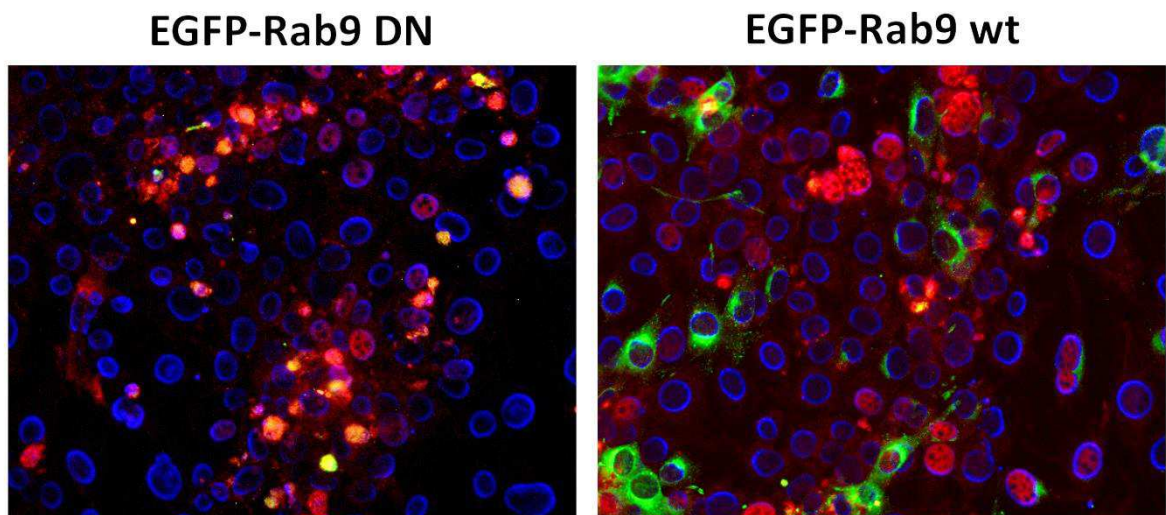
**Obr. 5.20.** Živé buňky 3T6 transfekované plazmidy exprimující GFP-Rab9 DN nebo EGFP-Rab9 wt (zeleně) pomocí nukleofekce (Amaxa), 24 hpt. Buňky transfekované Rab9 DN mají změněnou morfologii, část jich umírá.

V témže čase (24 hpt), byly transfekované buňky infikovány MPyV o různých multiplicitách (pro zjištění optimální míry infekce pro vyhodnocování). Transfekované buňky byly inkubovány s virovými inokuly a po 1 h bez odmývání viru bylo přidáno kompletní médium. Buňky byly fixovány 24 hpi a značeny protilátkou proti virovému LT antigenu. Též byla použita protilátka proti GFP ((ředěná 1000x) pro zesílení signálu EGFP-Rab 9 (obrázek 5.21). Byly vyhodnocovány vzorky se 4  $\mu$ l virového inokula na jamku ( $moi = cca 0,5$ ). Bohužel buňky produkující EGFP-Rab9 DN nebylo možno vyhodnotit, jelikož specificky umíraly. Pokus byl vyhodnocen pro Rab9 wt. Účinnost transfekce v tomto pokusu byla 21,6 %. Byly počítány buňky, které zároveň produkovaly EGFP-Rab9 wt a LT antigen. Jejich počet byl vztažen na celkový počet buněk produkujících EGFP-Rab9 wt (139 na 404). Byly též spočítány infikované buňky, které nebyly zelené, t.j. neprodukovaly EGFP-Rab9 wt avšak byly infikované, pozitivní na LT a jejich počet byl vztažen na celkový počet buněk neprodukujících ani EGFP-Rab9 wt ani LT (282 na 1467). Asi 34 % transfekovaných buněk produkujících EGFP-Rab9 wt bylo infikováno (pozitivních na LT), u buněk neprodukujících EGFP-Rab9 wt bylo infikováno asi 19 % (graf 5.6).





**Graf. 5.6. Vliv nadprodukce Rab9 wt na infekci MPyV (1).** Procenta infikovaných buněk u s nadprodukcí EGFP-Rab9 wt a kontrolních buněk neprodukujících EGFP-Rab9 wt.

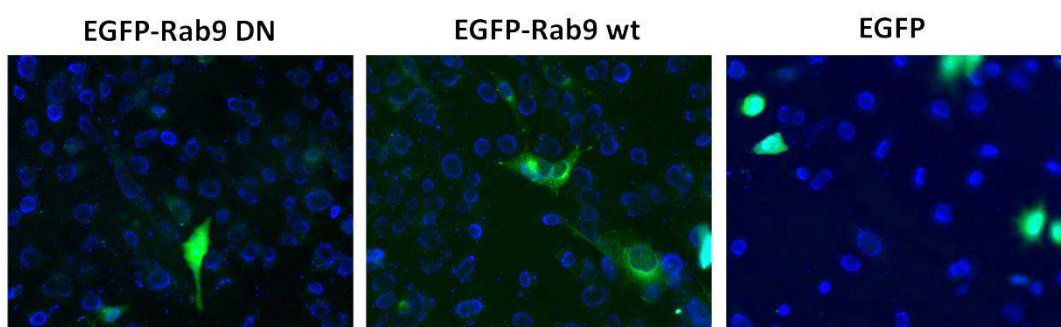


**Obr. 5.21. Reprezentativní pole z fluorescenčního mikroskopu ke grafu 5.6.** Buňky 3T6 produkující EGFP-Rab9 wt nebo EGFP-Rab9 DN (zeleně), LT antigen značen krysí monoklonální protilátkou (červeně). DNA značena modře (DAPI). Infikováno 24 hpt, fixováno 24 hpi.

Výsledky tohoto prvního pokusu naznačují, že nadprodukce funkční GTPázy Rab 9 zvyšuje infektivitu MPyV (dle grafu 5.6. o asi 15 %).

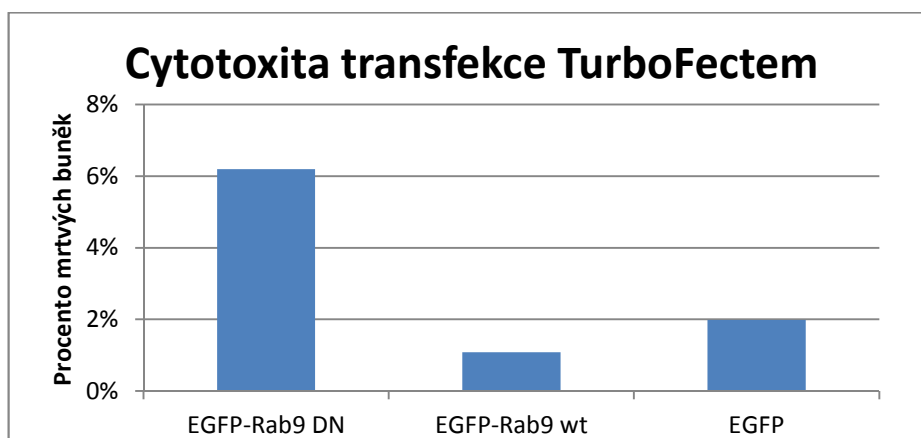
#### 5.4.4 Optimalizace transfekce

Protože metoda nukleofekce bývá spojena s poměrně vysokou mírou cytotoxicity, což se zvláště negativně projevilo u nukleofekce plazmidem pro expresi EGFP-Rab9 DN pokusili jsme se použít metodu transfekce pomocí TurboFectu. Tato metoda je šetrnější, ale ne tolik efektivní. Buňky 3T6 ve 4. pasáži narostlé na mikroskopických sklíčkách byly transfekovány 1 µg DNA plazmidem nesoucím gen pro EGFP-Rab9 wt, nebo gen pro EGFP-Rab9 DN nebo kontrolní plazmid produkující pouze EGFP. Buňky na sklíčkách byly fixovány 22 hpt a určena účinnost transfekce (obrázek 5.22). Rovněž byla změřena cytotoxicita transfekce (graf 5.7).



**Obr. 5.22.** Transfekce s použitím TurboFectu. Výběr reprezentativních snímků z fluorescenčního mikroskopu. Buňky byly fixovány v čase 22 hpt. Buňky produkující EGFP-Rab9 DN nebo EGFP-Rab9 wt, nebo EGFP (zeleně). DNA značena modře (DAPI).

Účinnost transfekce s použitím TurboFectu byla následovná: pro EGFP 18,9 %; pro EGFP-Rab9 wt 6,7 %; a EGFP-Rab9 DN 7,7 %



**Graf 5.7.** Cytotoxicita turbofekce. Procenta mrtvých buněk v čase 22 hpt pro EGFP-Rab9 DN, EGFP-Rab9 wt a EGFP byla zjištěna změřením aktivity laktát dehydrogenázy (LDH) uvolněné v médiu vztažené na celkovou aktivitu LDH v buňkách po lyzování Tritonem X-100.

Z grafu 5.7. vyplývá, že cytotoxicita transfekce turbofectem nepřesahuje u žádného z plasmidů 7 %. Nicméně vzhledem k velmi nízké účinnosti transfekce (pro oba studované plasmidy kolem 7%), byla pro další pokus zvolena opět metoda nukleofekce, kterou jsme se snažili předem optimalizovat.

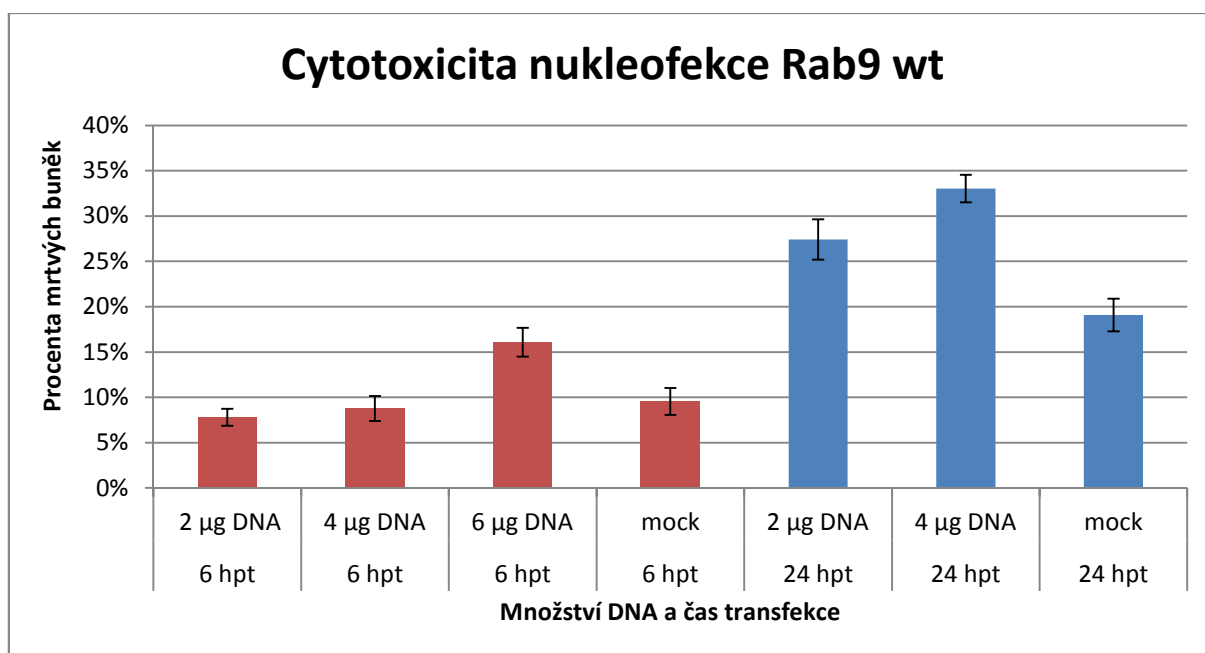
Buňky 3T6 (8. pasáž) byly transfekovány různým množstvím DNA plazmidu pro produkci EGFP-Rab9 wt (2 µg, 4 µg a 6 µg). V čase 6hpt byly odebrány vzorky na měření cytotoxicity a buňky byly fixovány a určena účinnost transfekce (procento transfekovaných).

Další pokus byl proveden pro čas 24 hpt. Byly rovněž transfekovány plazmidem EGFP-Rab9 wt v množství 2 µg, 4 µg a 6 µg DNA. Při transfeování 6 µg DNA bohužel došlo k chybě transfekce (elektický výboj). Po čase 24 hpt byly odebrány vzorky na měření cytotoxicity a po fixaci buněk spočítána účinnost transfekce.

Účinnost transfekce pro oba pokusy je uvedena v tabulce 5.3. Hodnoty měření cytotoxicity jsou znázorněny v grafu 5.8.

<b>EGFP-Rab9 wt</b>	<b>2 µg DNA</b>	<b>4 µg DNA</b>	<b>6 µg DNA</b>
<b>6 hpt</b>	17,3 %	23,1 %	38,7 %
<b>24 hpt</b>	20,2 %	34 %	(chyba transfekce)

**Tab. 5.3. Optimalizace množství plazmidové DNA pro nukleofekci.** Uvedeny jsou hodnoty účinnosti transfekce plazmidu EGFP- wt (2; 4; 6 µg) po nukleofekci (Amaxa) v časech 6 hpt a 24 hpt.

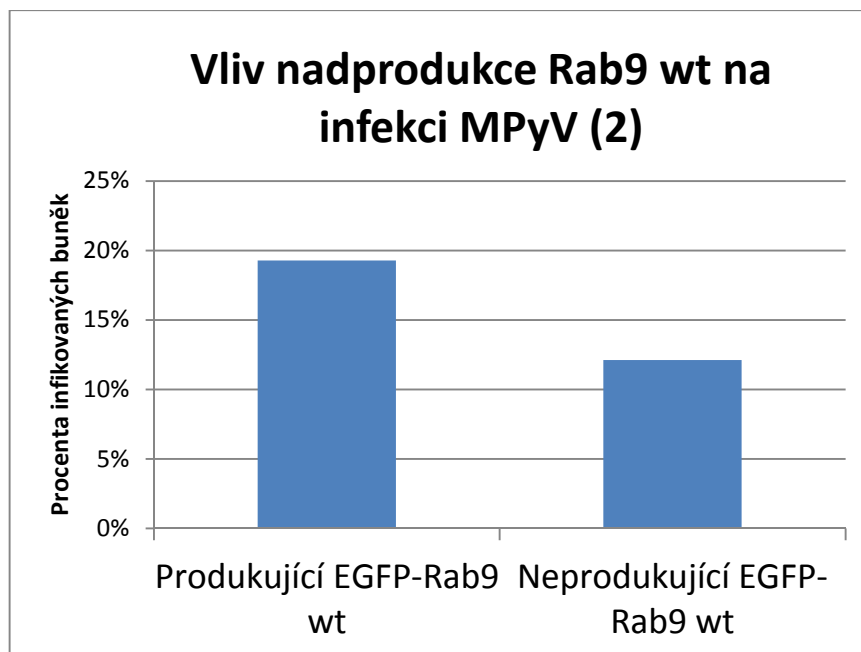


**Graf 5.8.** Cytotoxicita nukleofekce měřená 6 hpt nebo 24 hpt pro uvedená množství transfekovaného plasmidu pEGFP-Rab9 wt. Graf znázorňuje procenta mrtvých buněk v procentech. Mock = transfekce provedená bez DNA. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku pro triplikáty.

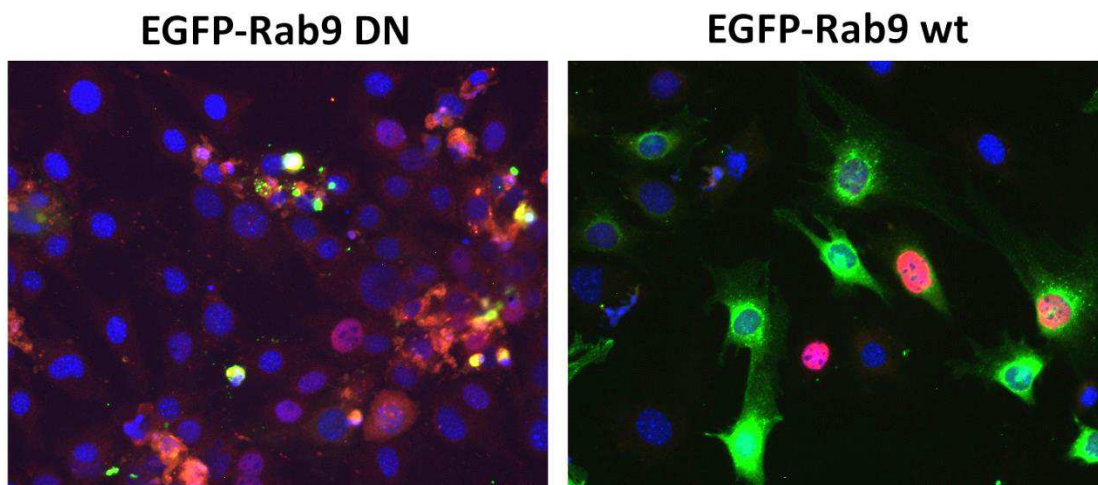
Množství 4 µg plazmidové DNA bylo zvoleno jako optimální, vzhledem k nárůstu cytotoxicity při použití 6 µg.

#### 5.4.5 Transfekce a infekce 2

Buňky 3T6 (13. pasáž) byly transfekovány nukleofekcí (Amaxa) plasmidem pEGFP-Rab9 wt nebo pEGFP-Rab9 DN. V čase 6 hpt byly buňky infikovány MPyV o multiplicitě  $moi = 1$ . Buňky byly fixovány v čase 24 hpi (t.j. 30 hpt) a imunofluorescenčně značeny na přítomnost LT antigenu. Signál EGFP byl zesílen králíčí protilátkou proti GFP (ředění 1000x). Byla spočítána účinnost transfekce, která pro EGFP-Rab9 wt činila 30%. U EGFP-Rab9 DN nemohla být opět určena účinnost, vzhledem k tomu že zablokování této GTPázy vedlo k umírání buněk (viz obrázek 5.23). Pro Rab9 wt byla spočítána procenta infikovaných buněk z buněk, z těch zelených, které produkovaly EGFP-Rab9 wt (230 na 1192) a procenta infikovaných buněk z těch, které neprodukovaly EGFP-Rab9 wt (337 na 2781). Buněk produkujících EGFP-Rab9 wt bylo infikováno 19%, zatímco těch neprodukujících asi 12 %, (graf 5.9).



**Graf 5.9. Vliv nadprodukce Rab9 wt na infektivitu MPyV (2).** Procenta infikovaných buněk s nadprodukcí EGFP-Rab9 wt a kontrolních buněk neprodukujících EGFP-Rab9 wt.



**Obr. 5.23. Reprezentativní snímky z fluorescenčního mikroskopu ke grafu 5.9.** Transfekované buňky plasmidy pEGFP-Rab9 DN a pEGFP-Rab9 wt byly infikovány MPyV o  $\text{moi} = 1$ . LT antigen značen pomocí krysí monoklonální protilátky (červeně). DNA značeno modře (DAPI). Infikováno 6 hpt, fixováno 24 hpi.

V obou provedených pokusech bylo cílem zjistit účast GTPázy Rab 9 v produktivním transportu MPyV do jádra pro jeho replikaci. Nadprodukce funkční GTPázy mírně (o 15% a o 7%) zvýšila infektivitu viru. To naznačuje, že by tato GTPáza mohla hrát roli v transportu MPyV z pozdních endozomů do ER. Bohužel, test s nadprodukcí dominantně negativní mutanty Rab9, který by byl průkaznější, se nepodařilo provést, protože buňky produkující tuto mutantu rychle umíraly.

## **6 Diskuze**

## 6.1 Vliv inhibitorů retrográdního transportu na infekci MPyV

Tato práce si kladla jako cíl zjistit, zdali MPyV využívá k transportu z pozdních endozomů do ER dráhu zprostředkovanou GTPázou Rab9, procházející TGN a využívající COPI vácíky. Nejprve bylo úkolem prověřit vliv inhibitorů retrográdního transportu, BFA a novějšího GCA na infekci MPyV. Oba tyto inhibitory inhibují GTPázu Arf přes její GEF, GBF1. Tato GTPáza reguluje vznik COPI vácíků. Ve formě s GTP se váže na membránu, dimerizuje a umožňuje sestavení coatomeru a odštěpení vácíku (Beck et al. 2011; Beck et al. 2008; Palmer et al. 1993). BFA je dlouho známý inhibitor využívaný ke studiu retrográdního transportu. Inhibuje retrográdní i anterogádní transport mezi GA a ER. BFA má ovšem pleiotropní efekt nejen na GA, ale též endozomální systém. Dochází k vytváření tubulárních útvarů z endozomálních vácíků. Oproti tomu je GCA reverzibilní, vysoce specifický inhibitor, jehož působení je omezeno pouze na GA. Způsobuje rozložení struktury celého GA i TGN, což má za následek zastavení transportu vedoucího přes tyto kompartmenty (Sáenz et al. 2009).

Před vlastními inhibičními pokusy byla zjišťována cytotoxicita obou inhibitorů. Ta u BFA v používaných koncentracích 500 ng/ml nepřesáhla 15 %, a u 50 ng/ml 8 % mrtvých buněk za 24 h. U GCA pro používanou koncentraci 20  $\mu$ M tyto hodnoty odpovídaly cca 19-22%.

Pro BFA (500 ng/ml) bylo zjištěno ve dvou nezávislých pokusech, že infektivita viru je podstatně snížena, po přidání inhibitoru současně s infekcí o 78%, 1 hpi o 73 - 78% a 3 hpi o 62 - 68%. Při použití koncentrace 50 ng/ml BFA se míra inhibice pohybovala kolem 46 %.

Pro GCA byla inhibice, pokud inhibitor působil od začátku infekce ještě vyšší (přes 90%) a inhibice klesla při přidání inhibitoru až 3 hpi (hodnoty kolem 50%). Vzhledem k deklarované reverzibilitě GCA bylo zajímavé zjistit, zdali MPyV po odmytí inhibitoru bude pokračovat v produktivní dráze, nebo jestli se dostane na do jiné, neproduktivní dráhy, tak jako mnoho neúspěšných virionů při infekci. Výsledky ukázaly, že pokud byl GCA odmyt v čase 3 hpi, míra inhibice dramaticky klesla (ve dvou pokusech byla pozorovaná inhibice jen 11 % a 18 %). Došlo patrně tedy jen k opoždění infekce.

Tyto výsledky naznačují, že MPyV při svém transportu využívá cestu přes TGN nebo GA a případně COPI vácíky. Použití BFA není ovšem tak specifické, inhibice by mohla být zapříčiněna změnami endozomálního systému. Avšak použitím inhibitoru vysoce specifického pro GA (GCA) vedlo k dramatickému poklesu infekce, obzvlášť v přidání v čase 0 hpi nebo 1 h před infekcí. Při pozdějším přidání inhibitorů již část virionů prošla



inhibovanou drahou, což je obzvlášť patrné pro čas 3 hpi. Z toho vyplývá, že pro produktivní infekci je třeba intaktní GA nebo TGN v časně fázi. MPyV nebyl nikdy pozorován přímo v GA, ani nekolokalizoval s markerem *cis*-GA (GM130), což ukazuje na důležitost TGN. K podpoře tohoto tvrzení byla navíc nalezena kolokalizace části virionů s markery TGN a COPI váčků (viz dále).

Vliv GCA nebyl zatím na jiných polyomavirech testován. Pouze v jedné studii na lidském papilomaviru 16 (HPV16), kdy inhiboval jeho transport (Day et al. 2013).

V první studii vlivu BFA na infektivitu MPyV nebyla zjištěna inhibice (Mannová & Forstová 2003). Byly použity buňky 3T6 a multiplicita infekce 50 pfu/buňka (pfu – plaque forming units). Virus byl odmýván až v čase přidání inhibitoru, pro každý čas probíhala internalizace viru různou dobu. Bylo tedy nutné pro každý čas mít samostatnou kontrolu bez přidání inhibitoru. Byla používána koncentrace BFA 500 ng/ml a buňky fixovány 24 hpi pro značení LT antigenu nebo 44 hpi pro VP1. Jako pozitivní kontrola byl použit virus SV40, pro který bylo ukázáno, že jeho infektivitu BFA inhibuje (Norkin et al. 2002). I v tomto případě byla inhibice infekce SV40 drastická. O rok později byla provedena další studie, kdy znovu testovali vliv BFA na MPyV (Gilbert & Benjamin 2004). Byly použity krysí buňky C6 (odvozené od gliomu) s gangliosidem GD1a. Buňky byly infikovány MPyV o multiplicitě asi 500 pfu/buňka, virus byl nechán internalizovat při 37 °C 1 hod a poté byl odmyt. Buňky byly fixovány 32 hpi. Při přidání inhibitoru do 2 hpi byla infekce inhibována o cca 75%. V pozdějších časech byl pozorován nárůst infekivity, přičemž po přidání 6 hpi nebyl zjištěn žádný účinek. Otázkou zůstává, proč u první studie nefungoval BFA na MPyV. Výsledky získané pro BFA v této práci jsou souhlasné se studií (Gilbert & Benjamin 2004).

Transport ostatních zkoumaných polyomavirů je též inhibován pomocí BFA. Pro SV40 byla zjištěna inhibice přidáním BFA před infekcí. Navíc byla ukázána přímá kolokalizace s markerem COPI váčků  $\beta$ COP v čase 3 hpi i 5 hpi (Norkin et al. 2002). V jiné studii, u JC viru a SV40 zjistili inhibici infekce Brefeldinem A, již v koncentraci 10 a 15 ng/ml (Querbes et al. 2006). Pokusy s BFA na BK viru měly za následek úplnou inhibici infekce (Low et al. 2006). I pro tyto další polyomaviry by bylo zajímavé zjistit vliv GCA vzhledem k dalším nespecifickým účinkům BFA, zda se nejedná pouze o vliv narušení endozomálního systému.

## 6.2 Studium kolokalizací MPyV s markery retrográdního transportu

Dalším cílem této práce bylo zjistit, zda MPyV prochází při svém transportu do ER *cis*-GA, kde nikdy MPyV pozorován nebyl nebo TGN, kde lokalizace zjišťována nebyla, a též COPI váčky, pro které byl z jejich neprůkazné kolokalizace učiněn závěr, že je MPyV patrně nevyužívá (Mannová & Forstová 2003). Pomocí konfokální mikroskopie lze sledovat kolokalizaci (překryv signálů ve stejném místě) dvou odlišně fluorescenčně značených proteinů (pro kapsidový protein VP1 MPyV a daný buněčný marker). Jako markery jsou využívány proteiny vyskytující se typicky v daném kompartmentu. Pro TGN je to TGN46, typickým markerem *cis*-GA je protein GM130 a pro COPI váčky je to  $\beta$  podjednotka coatomeru ( $\beta$  COP).

Pro GM130 nebyly pozorovány kolokalizace. Virus tedy neprochází *cis*-GA. Naproti tomu v obou sledovaných časech po infekci (1 hpi a 3 hpi) byla nalezena kolokalizace několika virionů s markerem TGN (TGN46). Vzhledem k tomu, že pouze malá část virionů dopraví svou DNA do jádra, zatímco mnoho virionů je buňkou svedeno do neproduktivní dráhy (Mannová & Forstová 2003), nelze předpokládat žádné masivní kolokalizace se všemi strukturami produktivní transportní dráhy. Je možné, že právě tyto sporadické kolokalizace jsou důležité pro produktivní infekci.

Nepotvrzení kolokalizace nemusí být úplně definitivní důkaz, že virus daným kompartmentem neprochází. Příkladem je průchod MPyV pozdními endozomy. Nejprve nebyla nalezena průkazná kolokalizace s markerem pozdních endozomů Rab7 (Mannová & Forstová 2003). Nicméně později se ukázalo, že exprese dominantně negativní mutanty Rab7 infekci snižovala, což ukázalo na důležitost pozdních endozomů v transportu MPyV. Též byly nalezeny sporadické kolokalizace s Rab7 (Qian & Tsai 2010; Zila et al. 2014; Qian et al. 2009). Průchod danými kompartmenty je totiž relativně rychlý a viriony v nich nezůstávají dlouho.

Ve světle těchto nálezů byla v této práci znovu přezkoumávána kolokalizace MPyV s COPI váčky. V dřívějších pracích byla ukázána masivní kolokalizace viru SV40 markerem COPI (Norkin et al. 2002), zatímco předchozí práce naší laboratoře pozorovala jen vzácnou, neprůkaznou kolokalizaci (Mannová & Forstová 2003). V této práci byly konfokálním mikroskopem s lepší rozlišovací schopností identifikovány viriony MPyV kolokalizující s  $\beta$ COP v čase 1 hpi a více 3 hpi. Pro tyto pokusy byla vhodnější nižší multiplicita infekce. Při použití většího množství viru může docházet ke shlukům, které mohou být zavádějící.

To, že by MPyV využíval dráhu zprostředkovanou COPI vácíky by bylo logické vzhledem k výsledkům pokusů s inhibitory tohoto typu transportu. COPI vácíky transportují retrogradně náklad z GA do ER. Též se účastní anterogradního transportu v rámci GA. MPyV nebyl pozorován přímo v GA, avšak výsledky naznačují, že prochází přes TGN. Opět, vzhledem k tomu, že v určitých jednotlivých časech po infekci nelze najít početnou kolokalizaci MPyV s pozdními endozomy, nelze očekávat ani masivní kolokalizaci virionů s dalšími strukturami na jejich cestě z těchto kompartmentů do ER. Navíc z pozdních endozomů jsou viriony patrně sortovány do různých kompartmentů (např. do lysozomů). V práci (Qian & Tsai 2010) je postulováno, že pouze viriony, které se na povrchu buňky navázaly k sialové kyselině gangliosidového receptoru (a ne k sialové kyselině jiné povrchové molekuly) jsou směřovány v pozdních endozomech do ER. K dalším ověření využití COPI transportu u SV40 bylo využito mikroinjekce anti  $\beta$ COP protilátky, což vedlo k inhibici infekce (Richards et al. 2002). Podobný experiment by mohl být proveden v budoucnu i pro MPyV.

Získané výsledky tedy odpovídají navrhované hypotéze, že část virionů na cestě z pozdních endozomů prochází TGN a odtud COPI vácíky do ER.

Naopak masivní kolokalizace viru byly pozorovány v minulosti krátce po vstupu monopinocytickými vácíky a jejich fúzi s časnými endozomy. Byly nalezeny masivní kolokalizace s jejich markery, GTPázou Rab5 a jejím efektorovým proteinem EEA1 (Mannová & Forstová 2003; Liebl et al. 2006b). Bylo pozorováno, že se v nich virus zdrží déle než některé jiné náklady, např. transferin (Mannová & Forstová 2003). Navíc časnými endozomy prochází i řada virionů, které jsou potom z produktivní dráhy svedeny. Také s markerem ER, chaperonem BiP, kolokalizuje MPyV výrazně, patrně proto, že se v něm zdrží.

Ale na druhou stranu kolokalizace s určitým markerem nemusí nutně znamenat jeho důležitost v produktivní infekci, jak bylo ukázáno u recyklujících endozomů a caveolinu-1. V několika studiích byla nalezena kolokalizace mezi MPyV a markery recyklujících endozomů, GTPázou Rab11 a transferinem (Liebl et al. 2006a; Mannová & Forstová 2003) v časech 1 hpi i 3 hpi. Na základě těchto zjištění byl navržen model, kdy MPyV využívá recyklující endozomy pro svůj transport do ER. Ovšem GTPáza Rab6, která řídí transport do TGN z recyklujících endozomů, s viriony nekolokalizovala (Mannová & Forstová 2003). Důkazem pro vyvrácení této teorie bylo, že exprese dominantně negativní mutanty Rab11

nemá vliv na infektivitu MPyV (Zila et al. 2014). Lokalizace MPyV v recyklujících endosomech je tedy jen svedení virionů buněčnou obranou do neproduktivní dráhy.

Silná kolokalizace SV40 s caveolinem-1 vedla k teorii tzv. caveozomů jako organel s neutrálním pH, odlišných od endozomů, kterými musí projít virus, má-li pokračovat do ER a dále do buněčného jádra (Pelkmans et al. 2001). Autoři se též domnívali, že endocytóza tohoto viru je závislá na caveolinu-1. Kolokalizace MPyV s caveolinem-1 byla rovněž pozorována (Richterová et al. 2001; Gilbert & Benjamin 2004) Později bylo ukázáno, že endocytóza MPyV je nezávislá na caveolinu-1. Nepermissivní buňky Jurkat neprodukující caveolin internalizovaly MPyV efektivně a navíc permissivní buňky produkující dominantně negativní mutantu caveolinu-1 byly infikovány stejně účinně, jako buňky kontrolní (Liebl et al. 2006b). Později autoři caveozomového modelu produktivní endocytické dráhy pro SV40 jejich závěry odvolali a ukázali, že produktivní cesta SV40 vede také přes klasické časně a pozdní endozomy (Hayer et al. 2010; Engel et al. 2011). Naopak, u MPyV bylo ukázáno, že virus se hromadí v kompartmentech bohatých na caveolin-1 na neproduktivní dráze (Zila et al. 2014).

### **6.3 Zkoumání účasti GTPázy Rab 9 na produktivním transportu MPyV**

Jedinou dostatečně prozkoumanou dráhou z pozdních endozomů do TGN je cesta regulovaná malou GTPázou Rab9 (Lombardi et al. 1993). Dalším cílem práce bylo zjistit, zdali se Rab9 na infekční dráze MPyV podílí. K tomu byly získány expresní plazmidy pro produkci dominantně negativní mutany (DN) a divokého typu (wt) Rab9. Dominantně negativní mutanta je forma nefunkčního enzymu, který navíc inhibuje funkci endogenního proteinu. Bylo předpokládáno, že pokud MPyV využívá transport z pozdních endozomů pomocí Rab9 do TGN, bude jeho infekce inhibována v buňkách produkující Rab9 DN. Též vliv nadprodukce Rab9 wt by usnadňoval virovou infekci. Produkce obou variant Rab9 bylo možné sledovat pomocí fúzního EGFP na N-konci Rab9.

Pro transfekci plazmidů do savčích buněk byla použita v laboratoři standardně používána metoda nukleofekce (Amaxa). Aplikací elektrického pulzu na buňky dojde k vytvoření tranzientních pórů v membráně, které umožní vstup cizorodé DNA. Je docíleno velké účinnosti transfekce, avšak aplikací pulzu značná část buněk umírá.

Ve dvou pokusech transfekce plasmidem pEGFP-Rab9 wt (6 a 4 µg) a následné infekce MPyV (v čase 24 hpt a 6 hpt) byly 24 hpi spočítána procenta infikovaných buněk nadprodukujících EGFP-Rab9 wt a kontrolních neprodukujících EGFP-Rab9 wt. V obou

pokusech bylo pozorováno mírné navýšení infektivity (o 15% a 7%). Tyto výsledky naznačují, že nadprodukce Rab9 pomáhá virové infekci. Bohužel se nezdařilo ověřit vliv dominantně negativní mutanty, což by tuto hypotézu podpořilo více. Produkci EGFP-Rab9 DN doprovázela vysoká cytotoxicita. Buňky, které produkovaly EGFP-Rab9 DN umíraly a nebylo možné je tedy počítat.

Vzhledem k vysoké cytotoxicitě metody nukleofekce (Amaxa), byl učiněn pokus použít šetrnější metodu transfekce a sice pomocí Turbofekce. Při ní je plazmidová DNA navázána na kationický polymer a takto doručena do buněk. Produkce začíná po delší době než u nukleofekce. Účinnost transfekce byla bohužel malá (pro plazmidy produkující wt a DN Rab9 kolem 7%, pro kontrolní plazmid produkující EGFP asi 19%). Změřena cytotoxicita této transfekce nebyla pro žádný ze vzorků vyšší než 7%, což ale souvisí s nízkou účinností transfekce.

Nepomohla ani nukleofekce. Množství DNA bylo sníženo z 6  $\mu$ g na 2 nebo 4  $\mu$ g. V časech 6 hpt a 24 hpt byla měřena cytotoxicita a účinnost transfekce. Při použití vyššího množství DNA byla lepší účinnost, avšak mezi 4  $\mu$ g a 6  $\mu$ g byl vyšší skok cytotoxicity. Pro 4  $\mu$ g DNA byl pokus transfekce s následnou infekcí zopakován. Buňky byly infikovány již 6 hpt. I v tomto případě bohužel většina buněk produkující EGFP-Rab9 DN lyzovala do času fixace 24 hpi a pokus nemohl být vyhodnocen.

Teoreticky by se mohla tato metoda transfekce dále optimalizovat, například kratším časem po transfekci, případně detekce LT po kratším čase po infekci. Případně zvolit a optimalizovat jinou metodu transfekce.

Vliv Rab9 na jiných polyomavirech dosud zkoumán nebyl. U HPV16 byla testována exprese dominantně negativních mutant Rab9 i Rab7b (Day et al. 2013). Obě inhibovaly transport pseudovirionů HPV16 do TGN. Zajímavé by bylo zjistit i vliv Rab7b na infektivitu MPyV. Je otázka, zda MPyV využívá Rab9 nebo i zároveň Rab7b. V rámci transportu nákladu regulovaného Rab proteinu existuje určitá redundance, například pro manóza-6-fosfátové receptory (MPR) (Progida et al. 2012).

Není úplně vyloučen transport MPyV též z časných a maturujících endozomů do TGN. Transport z časných a maturujících endozomů do TGN je umožňován pomocí komplexu proteinů zvaného retromer. Tento komplex vytváří na endozomálních membránách tubulární útvary sloužící k transportu do jiných kompartmentů. U savců se skládá z trimeru proteinů

Vps35, Vps29, Vps26, které interagují s dimerem SNX (sorting nexins) (Haft et al. 2000). SNX se vyskytují v několika formách, které mohou tvořit různé dimery (Rojas et al. 2007; Seaman et al. 2009; Haft et al. 2000). Dimer SNX se váže na membrány přes 3-fosfoinositidy a umožňuje vytváření tubulárních útvarů (Carlton et al. 2004). Trimer je zodpovědný za interakci s nákladem a vazbu na dimer (Seaman et al. 1998). Typický náklad, který je pomocí retromeru transportován z časných a maturujících endozomů do TGN jsou CI-MPR (na kationtech nezávislé MPR) a sortilin (Seaman 2004). Hlavní roli v regulaci tohoto transportu hraje GTPáza Rab7. Ve formě s GTP se váže na membrány, což umožňuje vazbu trimerního proteinu Vps na membránu (Seaman et al. 2009; Rojas et al. 2008). Tento transport je též regulován pomocí Rab5, nepřímo přes fosfatidylinositol-3-kinázu (PI3K). PI3K vytváří fosfatidylinositol-3-fosfát, přes který se vážou SNX na membrány (Rojas et al. 2008). Rab5 i Rab7 jsou regulovány svými GAP (GTPase activating protein) a GEF. Při maturaci časných endozomů dochází k výměně Rab5 za Rab7 (Rink et al. 2005). Tato výměna je důležitá pro transport pomocí retromeru (vazbu trimerního proteinu na membrány) (van Weering et al. 2012). Tento transport kromě toho vyžaduje mnoho dalších faktorů.

Infekci MPyV inhibuje exprese dominantně negativních mutantů GTPáz Rab5 a Rab7 (Liebl et al. 2006b; Zila et al. 2014; Qian et al. 2009). Kromě důležitosti časných a pozdních endozomů v infekci by tato závislost mohla předpokládat i využití retromeru pro transport do TGN. U HPV16 byla nalezena důležitost retromeru pro transport pomocí siRNA screeningu (Lipovsky et al. 2013). Též byla nalezena přímá interakce kapsidového proteinu L2 s retromerem (Popa et al. 2015). U polyomavirů ve studii na SV40 nebyla nalezena přímá interakce s retromerem s proteinem VP1, avšak v buňkách bez exprese SNX1 byla zpomalená virová infekce (Bradbury 2013; Lipovsky et al. 2013).

Vzhledem k tomu, že u transportu HPV16 byla infekce inhibována DN mutanty Rab9 i Rab7b (Day et al. 2013), by to mohlo naznačovat účast retromeru na transportu těmito GTPázami. Zatím jediná práce na buňkách *Drosophila* S2 ukazuje spolupráci Rab9 a retromeru na transportu proteinu Serp. Byla nalezena interakce a kolokalizace Vps35 a Rab9. Na tomto transportu se též podílí komplex WASH interagující s retromerem (Dong et al. 2013). Avšak předchozí studie na savčích buňkách nenalezly interakce Rab9 a retromeru (Rojas et al. 2008; Seaman et al. 2009). Otázkou tedy zůstává, kterou z těchto drah, případně kombinací, využívá MPyV. Pro objasnění tohoto tématu bude třeba dalšího výzkumu.

## **7 Souhrn**

**Tato práce si kladla za cíl přispět k objasnění transportu MPyV z pozdních endozomů do ER.**

- Byl zkoumán vliv inhibitorů retrográdního transportu Brefeldinu A a Golgicidu A na infekci MPyV. Oba inhibitory inhibovaly virovou infekci. U Golgicidu A, specifického inhibitoru rozrušujícího struktury GA i TGN byla ověřena jeho reverzibilita. Po jeho odmytí a další inkubaci dosáhla účinnost infekce MPyV cca 90% hladiny infekce v kontrolních buněk neošetřených inhibitorem.
- Pomocí konfokální mikroskopie byla zjištěna v časných hodinách po infekci (1 hpi a 3 hpi) kolokalizace části populace virionů MPyV s markery TGN (protein TGN46) a COPI váček ( $\beta$ COP). Kolokalizace markeru *cis*-GA (protein GM130) pozorována nebyla.
- S využitím plazmidů exprimujících gen pro GTPázu Rab9 a její dominantně negativní mutantu byla zjišťována účast této GTPázy v transportu MPyV do endoplasmatického retikula. Bohužel se nepodařilo zjistit vliv nadprodukce dominantně negativní mutanty Rab9 na transport MPyV kvůli její vysoké cytotoxicitě. Avšak při nadprodukcí *divokého typu* této GTPázy byla ve dvou nezávislých pokusech pozorována mírně (o 15 % nebo 7 %) zvýšená infektivita.
- Výše uvedené pokusy naznačují že MPyV využívá *trans*-Golgi síťovinu a COPI váčky pro transport do endoplazmatického retikula.



## **8 Seznam použité literatury**

- Abend, J.R., Jiang, M. & Imperiale, M.J., 2009. BK virus and human cancer: Innocent until proven guilty. *Seminars in Cancer Biology*, 19(4), pp.252–260.
- Adang, L. & Berger, J., 2015. Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *F1000 Research*, 4(Dec 10), pp.1–6.
- Allander, T. et al., 2007. Identification of a third human polyomavirus. *Journal of virology*, 81(8), pp.4130–6.
- Alpy, F. et al., 2013. STARD3 or STARD3NL and VAP form a novel molecular tether between late endosomes and the ER. *Journal of cell science*, 126(Pt 23), pp.5500–12.
- An, K. et al., 2000. Murine polyomavirus infection of 3T6 mouse cells shows evidence of predominant necrosis as well as limited apoptosis. *Virus Research*, 67(1), pp.81–90.
- Ashok, A. & Atwood, W.J., 2003. Contrasting roles of endosomal pH and the cytoskeleton in infection of human glial cells by JC virus and simian virus 40. *Journal of virology*, 77(2), pp.1347–1356.
- Barbero, P., Bittova, L. & Pfeffer, S.R., 2002. Visualization of Rab9-mediated vesicle transport from endosomes to the trans-Golgi in living cells. *Journal of Cell Biology*, 156(3), pp.511–518.
- Barouch, D.H. & Harrison, S.C., 1994. Interactions among the major and minor coat proteins of polyomavirus. *Journal of virology*, 68(6), pp.3982–3989.
- Beck, R. et al., 2011. Coatamer and dimeric ADP ribosylation factor 1 promote distinct steps in membrane scission. *Journal of Cell Biology*, 194(5), pp.765–777.
- Beck, R. et al., 2008. Membrane curvature induced by Arf1-GTP is essential for vesicle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105(33), pp.11731–6.
- Bradbury, F.A., 2013. Potential role for the retromer complex in polyomavirus infection. *Future Virol.*, 8(3), pp.215–217.
- Brady, J.N., Winston, V.D. & Consigli, R.A., 1977. Dissociation of polyoma virus by the chelation of calcium ions found associated with purified virions. *Journal of virology*, 23(3), pp.717–724.
- Burguete, A.S. et al., 2008. Rab and Arl GTPase Family Members Cooperate in the Localization of the Golgin GCC185. *Cell*, 132(2), pp.286–298.
- Cahan, L.D., Singh, R. & Paulson, J.C., 1983. Sialyloligosaccharide receptors of binding variants of polyoma virus. *Virology*, 130(2), pp.281–289.
- Calvignac-Spencer, S. et al., 2016. A taxonomy update for the family Polyomaviridae. *Archives of Virology*, pp.1–12.
- Carlton, J. et al., 2004. Sorting nexin-1 mediates tubular endosome-to-TGN transport through coincidence sensing of high- curvature membranes and 3-phosphoinositides. *Current Biology*, 14(20), pp.1791–1800.
- Carroll, K.S. et al., 2001. Role of Rab9 GTPase in facilitating receptor recruitment by TIP47. *Science*, 292(5520), pp.1373–1376.

- Caruso, M. et al., 2003. Alpha4beta1 integrin acts as a cell receptor for murine polyomavirus at the postattachment level. *Journal of virology*, 77(7), pp.3913–21.
- Cavaldesi, M. et al., 2004. Conformational changes of murine polyomavirus capsid proteins induced by sialic acid binding. *Journal of Biological Chemistry*, 279(40), pp.41573–41579.
- Clayson, E.T., Brando, L. V & Compans, R.W., 1989. Release of simian virus 40 virions from epithelial cells is polarized and occurs without cell lysis. *Journal of virology*, 63(5), pp.2278–88.
- Clever, J., Dean, D. a. & Kasamatsu, H., 1993. Identification of a DNA binding domain in simian virus 40 capsid proteins Vp2 and Vp3. *J Biol Chem.*, 268(28), pp.20877 –20883.
- Clever, J. & Kasamatsu, H., 1991. Simian virus 40 Vp2/3 small structural proteins harbor their own nuclear transport signal. *Virology*, 181(1), pp.78–90.
- Crémisi, C., Pignatti, P.F. & Yaniv, M., 1976. Random location and absence of movement of the nucleosomes on SV 40 nucleoprotein complex isolated from infected cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 73(3), pp.548–554.
- Dalyot-Herman, N. et al., 1996. The simian virus 40 packaging signal ses is composed of redundant DNA elements which are partly interchangeable. *J Mol Biol*, 259(1), pp.69–80.
- Damm, E.-M. et al., 2005. Clathrin-and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *The Journal of Cell Biology*, 168(3), pp.477–488.
- Daniels, R. et al., 2006. SV40 VP2 and VP3 Insertion into ER Membranes Is Controlled by the Capsid Protein VP1: Implications for DNA Translocation out of the ER. *Molecular Cell*, 24(6), pp.955–966.
- Daniels, R., Sadowicz, D. & Hebert, D.N., 2007. A very late viral protein triggers the lytic release of SV40. *PLoS Pathogens*, 3(7), pp.0928–0938.
- Day, P.M. et al., 2013. Identification of a role for the trans-Golgi network in human papillomavirus 16 pseudovirus infection. *Journal of virology*, 87(7), pp.3862–70.
- Díaz, E. & Pfeffer, S.R., 1998. Tip47: A cargo selection device for mannose 6-phosphate receptor trafficking. *Cell*, 93(3), pp.433–443.
- Díaz, E., Schimmüller, F. & Pfeffer, S.R., 1997. A novel Rab9 effector required for endosome-to-TGN transport. *Journal of Cell Biology*, 138(2), pp.283–290.
- Donaldson, J.G., Finazzi, D. & Klausner, R.D., 1992. Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. *Nature*, 360(6402), pp.350–352.
- Dong, B. et al., 2013. Rab9 and retromer regulate retrograde trafficking of luminal protein required for epithelial tube length control. *Nature communications*, 4, p.1358.
- Eden, E.R. et al., 2010. Membrane contacts between endosomes and ER provide sites for PTP1B-epidermal growth factor receptor interaction. *Nature cell biology*, 12(3), pp.267–72.

- Engel, S. et al., 2011. Role of endosomes in simian virus 40 entry and infection. *Journal of virology*, 85(9), pp.4198–4211.
- Erickson, K.D. et al., 2012. Virion assembly factories in the nucleus of polyomavirus-infected cells. *PLoS Pathogens*, 8(4).
- Ewers, H. et al., 2010. GM1 structure determines SV40-induced membrane invagination and infection. *Nature cell biology*, 12(1), pp.11–18; sup pp 1–12.
- Feng, H. et al., 2008. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5866), pp.1096–100.
- Fluck, M.M. & Schaffhausen, B.S., 2009. Lessons in signaling and tumorigenesis from polyomavirus middle T antigen. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 73(3), pp.542–63, Table of Contents.
- Forstova, J. et al., 1993. Cooperation of Structural Proteins during Late Events in the Life Cycle of Polyomavirus. *JOURNAL OF VIROLOGY*, pp.1405–1413.
- Fried, H., Cahan, L.D. & Paulson, J.C., 1981. Polyoma virus recognizes specific sialyloligosaccharide receptors on host cells. *Virology*, 109(1), pp.188–192.
- Ganley, I.G., Espinosa, E. & Pfeffer, S.R., 2008. A syntaxin 10-SNARE complex distinguishes two distinct transport routes from endosomes to the trans-Golgi in human cells. *Journal of Cell Biology*, 180(1), pp.159–172.
- García-Mata, R. et al., 2003. ADP-Ribosylation Factor/COPI-dependent Events at the Endoplasmic Reticulum-Golgi Interface Are Regulated by the Guanine Nucleotide Exchange Factor GBF1 □ V. *Molecular Biology of the Cell*, 14, pp.2250–2261.
- Gardner, S. et al., 1971. New Human Papovavirus (B.K.) Isolated From Urine After Renal Transplantation. *The Lancet*, 297(7712), pp.1253–1257.
- Gaynor, A.M. et al., 2007. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathogens*, 3(5), pp.0595–0604.
- Gilbert, J. et al., 2006. Downregulation of protein disulfide isomerase inhibits infection by the mouse polyomavirus. *Journal of virology*, 80(21), pp.10868–10870.
- Gilbert, J. & Benjamin, T., 2004. Uptake pathway of polyomavirus via ganglioside GD1a. *Journal of virology*, 78(22), pp.12259–67.
- Gilbert, J.M., Goldberg, I.G. & Benjamin, T.L., 2003. Cell penetration and trafficking of polyomavirus. *Journal of virology*, 77(4), pp.2615–22.
- Goodwin, E.C. et al., 2011. BiP and multiple DNAJ molecular chaperones in the endoplasmic reticulum are required for efficient simian virus 40 infection. *mBio*, 2(3).
- Gottlieb, K.A. & Villarreal, L.P., 2001. Natural biology of polyomavirus middle T antigen. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 65(2), pp.288–318 ; second and third pages, table of content.
- Gross, L., 1953. A Filterable Agent, Recovered from Ak Leukemic Extracts, Causing Salivary Gland Carcinomas in C3H Mice. *Experimental Biology and Medicine* , 83 (2 ), pp.414–421.

- Haft, C.R. et al., 2000. Human orthologs of yeast vacuolar protein sorting proteins Vps26, 29, and 35: assembly into multimeric complexes. *Molecular biology of the cell*, 11(12), pp.4105–16.
- Harder, T. & Simons, K., 1997. Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Current Opinion in Cell Biology*, 9(4), pp.534–542.
- Hayer, A. et al., 2010. Caveolin-1 is ubiquitinated and targeted to intraluminal vesicles in endolysosomes for degradation. *Journal of Cell Biology*.
- Huerfano, S. et al., 2010. Minor capsid proteins of mouse polyomavirus are inducers of apoptosis when produced individually but are only moderate contributors to cell death during the late phase of viral infection. *FEBS Journal*, 277(5), pp.1270–1283.
- Chang, D. et al., 1992a. Identification of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP2. *Virology*, 191(2), pp.978–983.
- Chang, D. et al., 1992b. The use of additive and subtractive approaches to examine the nuclear localization sequence of the polyomavirus major capsid protein VP1. *Virology*, 189(2), pp.821–827.
- Chang, D., Cai, X. & Consigli, R.A., 1993. Characterization of the DNA binding properties of polyomavirus capsid protein. *Journal of virology*, 67(10), pp.6327–31.
- Chen, L. & Fluck, M., 2001. Kinetic analysis of the steps of the polyomavirus lytic cycle. *Journal of virology*, 75(18), pp.8368–8379.
- Chen, X.S., Stehle, T. & Harrison, S.C., 1998. Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. *The EMBO Journal*, 17(12), pp.3233–3240.
- Cheng, J. et al., 2009. Cellular transformation by Simian Virus 40 and Murine Polyoma Virus T antigens. *Seminars in Cancer Biology*, 19(4), pp.218–228.
- Chia, P.Z.C. et al., 2011. Rab9-dependent retrograde transport and endosomal sorting of the endopeptidase furin. *Journal of cell science*, 124(Pt 14), pp.2401–2413.
- Choudhury, A. et al., 2002. Rab proteins mediate Golgi transport of caveola-internalized glycosphingolipids and correct lipid trafficking in Niemann-Pick C cells. *Journal of Clinical Investigation*, 109(12), pp.1541–1550.
- Christiansen, G. et al., 1977. Characterization of components released by alkali disruption of simian virus 40. *Journal of virology*, 21(3), pp.1079–1084.
- Ishov, A.M. & Maul, G.G., 1996. The periphery of nuclear domain 10 (ND10) as site of DNA virus deposition. *Journal of Cell Biology*, 134(4), pp.815–826.
- Jamboti, J.S., 2016. BK virus nephropathy in renal transplant recipients. *Nephrology*, p.n/a–n/a.
- Jiang, M. et al., 2009. Early Events during BK Virus Entry and Disassembly. *Journal of virology*, 83(3), pp.1350–1358.
- Jiang, M. et al., 2011. Functional Reorganization of Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies During BK Virus Infection. *mBio*, 2(1).

- Jul-Larsen, ?sne et al., 2004. PML-nuclear bodies accumulate DNA in response to polyomavirus BK and simian virus 40 replication. *Experimental Cell Research*, 298(1), pp.58–73.
- Kean, J.M. et al., 2009. Seroepidemiology of Human Polyomaviruses. *PLoS Pathogens*, 5(3), p.e1000363.
- Korup, S. et al., 2013. Identification of a Novel Human Polyomavirus in Organs of the Gastrointestinal Tract. *PLoS ONE*, 8(3).
- Liddington, R.C. et al., 1991. Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature*, 354, pp.278–284.
- Liebl, D. et al., 2006a. Mouse Polyomavirus Enters Early Endosomes , Requires Their Acidic pH for Productive Infection , and Meets Transferrin Cargo in Rab11-Positive Endosomes. , 80(9), pp.4610–4622.
- Liebl, D. et al., 2006b. Mouse Polyomavirus Enters Early Endosomes , Requires Their Acidic pH for Productive Infection , and Meets Transferrin Cargo in Rab11-Positive Endosomes ˇtokrova. *JOURNAL OF VIROLOGY*, 80(9), pp.4610–4622.
- Lilley, B.N. et al., 2006. Murine polyomavirus requires the endoplasmic reticulum protein Derlin-2 to initiate infection. *Journal of virology*, 80(17), pp.8739–8744.
- Lim, E.S. et al., 2013. Discovery of STL polyomavirus, a polyomavirus of ancestral recombinant origin that encodes a unique T antigen by alternative splicing. *Virology*, 436(2), pp.295–303.
- Lipovsky, A. et al., 2013. Genome-wide siRNA screen identifies the retromer as a cellular entry factor for human papillomavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(18), pp.7452–7.
- Lippincott-Schwartz, J. et al., 1991. Brefeldin A's effects on endosomes, lysosomes, and the TGN suggest a general mechanism for regulating organelle structure and membrane traffic. *Cell*, 67(3), pp.601–616.
- Lombardi, D. et al., 1993. Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network. *The EMBO journal*, 12(2), pp.677–82.
- Low, J.A. et al., 2006. Identification of gangliosides GD1b and GT1b as receptors for BK virus. *Journal of virology*, 80(3), pp.1361–6.
- Lowe, S.W. et al., 1994. Abrogation of oncogene-associated apoptosis allows transformation of p53-deficient cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(6), pp.2026–30.
- Luzio, J.P. et al., 1990. Identification, sequencing and expression of an integral membrane protein of the trans-Golgi network (TGN38). *The Biochemical journal*, 270(1), pp.97–102.
- Magnuson, B., Rainey, E.K., et al., 2005. ERp29 triggers a conformational change in polyomavirus to stimulate membrane binding. *Molecular Cell*, 20(2), pp.289–300.
- Magnuson, B., Rainey, E.K., et al., 2005. ERp29 triggers a conformational change in

- polyomavirus to stimulate membrane binding. *Molecular Cell*, 20(2), pp.289–300.
- Mannová, P. et al., 2002. Analysis of mouse polyomavirus mutants with lesions in the minor capsid proteins. *Journal of General Virology*, 83(9), pp.2309–2319.
- Mannová, P. & Forstová, J., 2003. Mouse polyomavirus utilizes recycling endosomes for a traffic pathway independent of COPI vesicle transport. *Journal of virology*, 77(3), pp.1672–1681.
- van der Meijden, E. et al., 2010. Discovery of a new human polyomavirus associated with Trichodysplasia Spinulosa in an immunocompromized patient. *PLoS Pathogens*, 6(7), pp.1–10.
- Mishra, N. et al., 2014. Identification of a novel Polyomavirus in a pancreatic transplant recipient with retinal blindness and Vasculitic Myopathy. *Journal of Infectious Diseases*, 210(10), pp.1595–1599.
- Montross, L. et al., 1991. Nuclear Assembly of Polyomavirus Capsids in Insect Cells Expressing the Major Capsid Protein VP1. *JOURNAL OF VIROLOGY*, pp.4991–4998.
- Moreland, R.B. & Garcea, R.L., 1991. Characterization of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP1. *Virology*, 185(1), pp.513–518.
- Moreland, R.B., Montross, L. & Garcea, R.L., 1991. Characterization of the DNA-binding properties of the polyomavirus capsid protein VP1. *Journal of virology*, 65(3), pp.1168–76.
- Moriyama, T. & Sorokin, A., 2008. Intracellular trafficking pathway of BK Virus in human renal proximal tubular epithelial cells. *Virology*, 371(2), pp.336–349.
- Nakamura, N. et al., 1995. Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130. *Journal of Cell Biology*, 131(6 II), pp.1715–1726.
- Nakanishi, A. et al., 2006. Identification of amino acid residues within simian virus 40 capsid proteins Vp1, Vp2, and Vp3 that are required for their interaction and for viral infection. *Journal of virology*, 80(18), pp.8891–8898.
- Nakanishi, A. et al., 2007. Minor capsid proteins of simian virus 40 are dispensable for nucleocapsid assembly and cell entry but are required for nuclear entry of the viral genome. *Journal of virology*, 81(8), pp.3778–85.
- Nemethova, M., Smutny, M. & Wintersberger, E., 2004. Transactivation of E2F-regulated genes by polyomavirus large T antigen: evidence for a two-step mechanism. *Molecular and Cellular Biology*, 24(24), pp.10986–10994.
- Norkin, L.C. et al., 2002. Caveolar endocytosis of simian virus 40 is followed by brefeldin A-sensitive transport to the endoplasmic reticulum, where the virus disassembles. *Journal of virology*, 76(10), pp.5156–5166.
- Oppenheim, A. et al., 1992. A cis-acting DNA signal for encapsidation of simian virus 40. *Journal of Virology*, 66(9), pp.5320–5328.
- Padgett, B.L. et al., 1971. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet*, 1(7712), pp.1257–1260.

- Palmer, D.J. et al., 1993. Binding of coatamer to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor. *Journal of Biological Chemistry*, 268(16), pp.12083–12089.
- Pelkmans, L., Kartenbeck, J. & Helenius, A., 2001. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nature cell biology*, 3(5), pp.473–483.
- Pelkmans, L., Püntener, D. & Helenius, A., 2002. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5567), pp.535–9.
- Peretti, A. et al., 2015. Genome Sequence of a Fish-Associated Polyomavirus, Black Sea Bass (*Centropomus striata*) Polyomavirus 1. *Genome announcements*, 3(1), pp.e01476–14.
- Pho, M.T., Ashok, A. & Atwood, W.J., 2000. JC virus enters human glial cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *Journal of virology*, 74(5), pp.2288–2292.
- Ponnambalam, S. et al., 1996. Primate homologues of rat TGN38: primary structure, expression and functional implications. *Journal of cell science*, 109 ( Pt 3, pp.675–685.
- Popa, A. et al., 2015. Direct Binding of Retromer to Human Papillomavirus Type 16 Minor Capsid Protein L2 Mediates Endosome Exit during Viral Infection. *PLoS Pathogens*, 11(2), pp.1–21.
- Progida, C. et al., 2012. Dynamics of Rab7b-Dependent Transport of Sorting Receptors. *Traffic*, 13(9), pp.1273–1285.
- Qian, M. et al., 2009. A lipid receptor sorts polyomavirus from the endolysosome to the endoplasmic reticulum to cause infection. *PLoS Pathogens*, 5(6).
- Qian, M. & Tsai, B., 2010. Lipids and proteins act in opposing manners to regulate polyomavirus infection. *Journal of virology*, 84(19), pp.9840–52.
- Querbes, W. et al., 2006. Invasion of host cells by JC virus identifies a novel role for caveolae in endosomal sorting of noncaveolar ligands. *Journal of virology*, 80(19), pp.9402–9413.
- Rainey-Barger, E.K., Magnuson, B. & Tsai, B., 2007. A chaperone-activated nonenveloped virus perforates the physiologically relevant endoplasmic reticulum membrane. *Journal of virology*, 81(23), pp.12996–3004.
- Reddy, J. V et al., 2006. A Functional Role for the GCC185 Golgin in Mannose 6-Phosphate Receptor Recycling. *Molecular Biology of the Cell*, 17, pp.4353–4363.
- Richards, A.A. et al., 2002. Inhibitors of COP-mediated Transport and Cholera Toxin Action Inhibit Simian Virus 40 Infection. *Molecular Biology of the Cell*, 13, pp.1750–1764.
- Richterová, Z. et al., 2001. Caveolae are involved in the trafficking of mouse polyomavirus virions and artificial VP1 pseudocapsids toward cell nuclei. *Journal of virology*, 75(22), pp.10880–10891.
- Rink, J. et al., 2005. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell*, 122(5), pp.735–749.
- Rocha, N. et al., 2009. Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7-RILP-p150 Glued and late endosome positioning. *The Journal of cell biology*,



- 185(7), pp.1209–25.
- Rojas, R. et al., 2007. Interchangeable but essential functions of SNX1 and SNX2 in the association of retromer with endosomes and the trafficking of mannose 6-phosphate receptors. *Molecular and cellular biology*, 27(3), pp.1112–24.
- Rojas, R. et al., 2008. Regulation of retromer recruitment to endosomes by sequential action of Rab5 and Rab7. *Journal of Cell Biology*, 183(3), pp.513–526.
- Sáenz, J.B. et al., 2009. Golgicide A reveals essential roles for GBF1 in Golgi assembly and function. *Nature chemical biology*, 5(3), pp.157–65.
- Salunke, D.M., Caspar, D.L.D. & Garcea, R.L., 1986. Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. *Cell*, 46(6), pp.895–904.
- Sanjuan, N., Porrás, A. & Otero, J., 2003. Microtubule-dependent intracellular transport of murine polyomavirus. *Virology*, 313(1), pp.105–116.
- Scuda, N. et al., 2011. A Novel Human Polyomavirus Closely Related to the African. *Journal of virology*, 85(9), pp.4586–4590.
- Seaman, M.N.J., 2004. Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer. *Journal of Cell Biology*, 165(1), pp.111–122.
- Seaman, M.N.J. et al., 2009. Membrane recruitment of the cargo-selective retromer subcomplex is catalysed by the small GTPase Rab7 and inhibited by the Rab-GAP TBC1D5. *Journal of cell science*, 122, pp.2371–2382.
- Seaman, M.N.J., McCaffery, J.M. & Emr, S.D., 1998. A membrane coat complex essential for endosome-to-Golgi retrograde transport in yeast. *Journal of Cell Biology*, 142(3), pp.665–681.
- Shishido-Hara, Y. et al., 2004. Major and minor capsid proteins of human polyomavirus JC cooperatively accumulate to nuclear domain 10 for assembly into virions. *Journal of virology*, 78(18), pp.9890–903.
- Schelhaas, M. et al., 2007. Simian Virus 40 Depends on ER Protein Folding and Quality Control Factors for Entry into Host Cells. *Cell*, 131(3), pp.516–529.
- Schowalter, R.M. et al., 2010. Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. *Cell Host and Microbe*, 7(6), pp.509–515.
- Siebrasse, E.A. et al., 2012. Identification of MW Polyomavirus, a Novel Polyomavirus in Human Stool. *Journal of Virology*, 86(19), pp.10321–10326.
- Simons, K. & Ikonen, E., 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387(6633), pp.569–72.
- Stehle, T. et al., 1994. Structure of murine polyomavirus complexed with an oligosaccharide receptor fragment. *Nature*, 369(6476), pp.160–3.
- Stehle, T. & Harrison, S.C., 1996a. Crystal structures of murine polyomavirus in complex with straight-chain and branched-chain sialyloligosaccharide receptor fragments. *Structure*, 4(2), pp.183–194.

- Stehle, T. & Harrison, S.C., 1996b. Crystal structures of murine polyomavirus in complex with straight-chain and branched-chain sialyloligosaccharide receptor fragments. *Structure*, 4(2), pp.183–194.
- Stehle, T. & Harrison, S.C., 1997. High-resolution structure of a polyomavirus VP1-oligosaccharide complex: Implications for assembly and receptor binding. *EMBO Journal*, 16(16), pp.5139–5148.
- Streuli, C.H. & Griffin, B.E., 1987. Myristic acid is coupled to a structural protein of polyoma virus and SV40. *Nature*, 326(6113), pp.619–622.
- Sweet, B.H. & Hilleman, M.R., 1960. The vacuolating virus, S.V. 40. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 105, pp.420–427.
- Španielová, H. et al., 2014. The encapsidation of polyomavirus is not defined by a sequence-specific encapsidation signal. *Virology*, 450-451, pp.122–131.
- Taube, S., Jiang, M. & Wobus, C.E., 2010. Glycosphingolipids as Receptors for Non-Enveloped Viruses. *Viruses*, 2, pp.1011–1049.
- Tooze, J., 1992. In AtT20 and HeLa Cells Brefeldin A Induces the Fusion of Tubular Endosomes and Changes Their Distribution and Some of Their Endocytic Properties. *The Journal of cell biology*, 118(4), pp.813–830.
- Tsai, B. et al., 2003. Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *EMBO Journal*, 22(17), pp.4346–4355.
- Walczak, C.P. & Tsai, B., 2011. A PDI family network acts distinctly and coordinately with ERp29 to facilitate polyomavirus infection. *Journal of virology*, 85(5), pp.2386–96.
- van Weering, J.R.T., Verkade, P. & Cullen, P.J., 2012. SNX-BAR-mediated endosome tubulation is co-ordinated with endosome maturation. *Traffic*, 13(1), pp.94–107.
- Winston, V.D., Bolen, J.B. & Consigli, R.A., 1980. Isolation and Characterization of Polyoma Uncoating Intermediates from the Nuclei of Infected Mouse Cellst. *JOURNAL OF VIROLOGY*, pp.1173–1181.
- Yang, L. et al., 1987. Roles of DNA topoisomerases in simian virus 40 DNA replication in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(4), pp.950–4.
- Yang, S.I. et al., 1991. Control of protein phosphatase 2A by simian virus 40 small-t antigen. *Molecular and cellular biology*, 11(4), pp.1988–1995.
- Zila, V. et al., 2014. Involvement of microtubular network and its motors in productive endocytic trafficking of mouse polyomavirus. *PLoS ONE*, 9(5).